

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GISLAINE CRISTINA SCODELER

**ENSAIOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DE COVID-19 E
PREDIÇÃO DE UM EPÍTOPO RACIONALMENTE SELECIONADO DA PROTEÍNA
DO ENVELOPE VIRAL**

ALFENAS/MG

2022

GISLAINE CRISTINA SCODELER

**ENSAIOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DE COVID-19 E
PREDIÇÃO DE UM EPÍTOPO RACIONALMENTE SELECIONADO DA PROTEÍNA
DO ENVELOPE VIRAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas Biblioteca Central

Scodeler, Gislaine Cristina.

Ensaio clínico de fármacos no tratamento de Covid-19 e predição de um epítipo racionalmente selecionado da proteína do envelope viral /

Gislaine Cristina Scodeler. - Alfenas, MG, 2022.

90 f. : il. -

Orientador(a): Leonardo Augusto De Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Covid-19. 2. Ensaio clínico. 3. SARS-CoV-2. 4. Epítipos. 5. Imunoinformática. I. De Almeida, Leonardo Augusto, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GISLAINE CRISTINA SCODELER

**ENSAIOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DE COVID-19 E
PREDIÇÃO DE UM EPÍTOPO RACIONALMENTE SELECIONADO DA PROTEÍNA
DO ENVELOPE VIRAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Interação Patógeno
Hospedeiro.

Aprovada em: 16 de maio de 2022.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Prof^a. Dr^a. Amanda Latercia Tranches Dias Assinatura:
Universidade Federal de Alfenas

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Carlos-Bender Assinatura:
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - Campus
Sertãozinho



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 16/05/2022, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Professor do Magistério Superior**, em 09/06/2022, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Carlos-Bender, Usuário Externo**, em 09/06/2022, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0729848** e o código CRC **3DED047**

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca me desamparou.

A minha mãe que mesmo sem entender muito bem minhas escolhas enquanto pesquisadora-cientista sempre esteve do meu lado e ao meu irmão por ser meu porto seguro e meu melhor amigo, por segurar todas as barras da vida ao meu lado.

Aos meus amigos, que me acompanham desde a faculdade, Leandro, Bárbara e Bianca obrigada por entenderem (mesmo que a contragosto) a minha ausência, ainda maior nesse período.

A minha amiga Fabíola, por compartilhar a vida e os cafés, a imunologia, os ensinamentos, os choros e por não me deixar desistir.

A Monique, que me apoiou e me deu forças quando eu dizia que não ia dar conta. Sua amizade foi um dos presentes que o mestrado me deu.

A Ana, Leonardo, Karen, Natalia, Maria Eduarda e Letícia por serem tão disponíveis e me auxiliarem em todas as etapas, pelo trabalho duro. O LaBioMol não seria o mesmo sem vocês.

A todos os colegas do PPGCB, vocês fizeram a caminhada mais leve.

Ao Professor Leonardo por desde o primeiro contato ter se mostrado disponível, por entender as questões logísticas, por todos os ensinamentos, pelos puxões de orelha que sempre foram tão delicados, pelo apoio, dedicação e pela bagagem científica infindável.

As professoras Patrícia Corsetti, Fernanda Tana e Amanda Tranches pela disponibilidade e carinho com que avaliaram minha qualificação.

Aos Professores Masaharu, Pedro, Ivo, Luiz Felipe, Eduardo, Marcos, Eva, Livia Diniz e Ana Carolina por todo conhecimento transmitido.

Aos meus chefes por entenderem e me apoiarem durante o processo.

Aos meus alunos da pós graduação em Microbiologia pela torcida.

Ao Ministério da Educação (MEC) e a Universidade Federal de Alfenas pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Educação é uma descoberta progressiva da nossa própria ignorância.”
(Voltaire)

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no primeiro mês de 2022 havia cerca de 300 milhões de casos confirmados de COVID-19, doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2 que ocasionou mais de 5.900.000 mortes em todo o mundo. Uma pandemia foi declarada pela OMS em março de 2020, quando o novo coronavírus se espalhou pelo mundo e novas variantes vêm dificultando o controle das infecções. O curto espaço de tempo entre os primeiros casos em Wuhan e a declaração de uma pandemia iniciou a busca por maneiras de impedir a disseminação do SARS-CoV-2 ou de tentar curar a doença COVID-19. Mais do que nunca, grupos de pesquisa estão desenvolvendo vacinas, fármacos e compostos imunobiológicos, também estão tentando reposicionar fármacos já existentes em um número crescente de testes clínicos. Há grandes expectativas em relação à profilaxia por meio das vacinas ao redor do mundo que já se mostram eficazes para a prevenção do COVID-19. No entanto, produzir doses suficientes de vacinas, disponibilidade igualitária para toda a população mundial e o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 são desafios cada vez mais observados. Apesar disso, esforços têm sido feitos para criar diferentes vacinas com diferentes abordagens para que possam ser utilizadas por toda a população. Neste trabalho, resumimos 3.743 ensaios clínicos em diferentes fases, mostrando um maior número de ensaios clínicos baseados em estudos de desenvolvimento ou reposicionamento de fármacos na Europa e nos EUA e ensaios clínicos em menor número em países de baixa renda. Resultados promissores sobre o reposicionamento e desenvolvimento de novos fármacos, anticorpos monoclonais, plasma convalescente e células-tronco mesenquimais para controle da infecção/replicação viral ou da resposta hiperinflamatória do hospedeiro frente ao novo coronavírus trazendo esperança para o tratamento da doença. Nesse contexto, as proteínas estruturais do novo coronavírus, como a proteína do envelope viral (E), se mostram promissoras como alvos moleculares específicos na busca por fármacos ou até mesmo de identificação de imunostimulantes. Assim, nesse trabalho também objetivamos identificar epítomos imunostimulantes na proteína do envelope do SARS-CoV-2. Utilizando o banco de dados NCBI SARS-CoV-2 Resources, 53.838 genomas depositados do novo coronavírus foram utilizados para identificação do gene codificador da proteína E seguido da tradução *in silico* e sobreposição das sequências dos 75 aminoácidos dessa proteína para identificação de uma proteína E consenso mundial. Essa sequência foi utilizada para a identificação por modelagem molecular da estrutura tridimensional e para análises *in silico* de identificação de potenciais epítomos imunostimulatórios capazes de serem apresentados via MHC-I ou MHC-II ou serem reconhecidos pelos BCRs, e dos parâmetros físico-químicos e de *docking molecular* com as moléculas de MHC, um epítomo linear promissor da proteína E foi identificado: LVKPSFYVYSRVKLNLS. Ensaios *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para a confirmação dos resultados obtidos *in silico* para que esse peptídeo possa ser potencialmente utilizado como um componente vacinal ou até mesmo como alvo molecular para diagnóstico da presença da infecção causada pelo SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; Ensaios clínicos; SARS-CoV-2; Reposicionamento de Fármacos; Proteína do envelope; Epítomos; Imunoinformática.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), in the first month of 2022 there were about 300 million confirmed cases of COVID-19, a respiratory disease caused by the SARS-CoV-2 virus that has caused more than 5,900,000 deaths worldwide. . A pandemic was declared by the WHO in March 2020, when the new coronavirus spread around the world and new variants are making it difficult to control infections. The short time between the first cases in Wuhan and the declaration of a pandemic started the search for ways to stop the spread of SARS-CoV-2 or to try to cure the disease COVID-19. More than ever, research groups are developing vaccines, drugs and immunobiological compounds, they are also trying to reposition existing drugs in an increasing number of clinical trials. There are great expectations regarding prophylaxis through vaccines around the world that have already proven to be effective for the prevention of COVID-19. However, producing sufficient doses of vaccines, equitable availability for the entire world population, and the emergence of new variants of SARS-CoV-2 are increasingly observed challenges. Despite this, efforts have been made to create different vaccines with different approaches so that they can be used by the entire population. In this work, we summarize about 3,743 clinical trials in different phases, showing a greater number of clinical trials based on drug development or repositioning studies in Europe and the USA and fewer clinical trials in low-income countries. Promising results on the repositioning and development of new drugs, monoclonal antibodies, convalescent plasma and mesenchymal stem cells to control viral infection/replication or the hyperinflammatory response of the host to the new coronavirus, bringing hope for the treatment of the disease. In this context, the structural proteins of the new coronavirus, such as the viral envelope protein (E), are promising as specific molecular targets in the search for drugs or even in the identification of immunostimulants. Thus, in this work we also aimed to identify immunostimulatory epitopes in the SARS-CoV-2 envelope protein. Using the NCBI SARS-CoV-2 Resources database, 53,838 deposited genomes of the new coronavirus were used to identify the gene encoding the E protein, followed by *in silico* translation and overlapping sequences of the 75 amino acids of this protein to identify a consensus E protein world. This sequence was used for the identification by molecular modeling of the three-dimensional structure and for *in silico* analysis of potential immunostimulatory epitopes capable of being presented via MHC-I or MHC-II or recognized by BCRs, and of the physicochemical and molecular docking with MHC molecules, a promising linear epitope of the E protein was identified: LVKPSFYVYSRVKLNLS. *In vitro* and *in vivo* assays must be performed to confirm the results obtained *in silico* so that this peptide can potentially be used as a vaccine component or even as a molecular target for diagnosing the presence of infection caused by SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19; Clinical trials; SARS-CoV-2; Drug repositioning; Envelope Protein; Epitopes; Immunoinformatics.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1- | Estrutura da partícula viral do SARS- CoV-2 | 17 |
| Figura 2- | <i>Pipeline</i> da metodologia da busca de dados..... | 22 |
| Figura 3- | Total dos ensaios clínicos em todo o mundo..... | 23 |
| Figura 4- | Ensaio clínico para Covid-19 em todo o mundo..... | 24 |
| Figura 5- | Mecanismo de ação de novos medicamentos..... | 30 |
| Figura 1- | <i>Pipeline</i> da obtenção da sequência consenso | 70 |
| Figura 2- | Alinhamento da sequência primária dos aminoácidos..... | 76 |
| Figura 3- | Epítomos, sítios transmembranares e n-glicanos..... | 78 |
| Figura 4- | Representação em diagrama 3D da modelagem molecular por homologia..... | 79 |
| Figura 5- | <i>Docking</i> molecular..... | 81 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|-----------------------------------|----|
| Quadro 1- | Novos Fármacos..... | 26 |
| Quadro 2- | Reposicionamento de fármacos..... | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 – | Proteínas do envelope de SARS- CoV- 2 depositadas em bancos de dados..... | 75 |
| Tabela 2 – | Epítomos da proteína estrutural E do SARS- CoV-2..... | 76 |
| Tabela 3 – | Antigenicidade, alergenicidade e propriedades físico-químicas do epítomo selecionado para a proteína consenso do envelope de SARS- CoV-2..... | 78 |
| Tabela 4 – | <i>Docking</i> molecular entre epítomos selecionados do consenso da proteína estrutural e HLAs..... | 80 |
| Tabela 5 – | Interações entre epítomo e alelos..... | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| ARBs | Bloqueadores do receptor da angiotensina |
| CP | Plasma convalescente |
| CTM | Células-tronco mesenquimais |
| CoVs | Coronavírus |
| DPOC | Doença pulmonar obstrutiva crônica |
| FDA | Food and Drug Administration |
| HLA | Antígeno Leucocitário Humano |
| IECA | Inibidores da enzima de conversão da angiotensina |
| IFN- β | Interferon beta |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| kDa | Kilodaltons |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NCBI | National Center of Biotechnology Information |
| NIH | National Institutes of Health |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ORFs | Fase de leitura aberta |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SK2 | Esfingosina quinase-2 |
| TMD | Domínio transmembranar hidrofóbico |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| UNIFAL-MG | Universidade Federal de Alfenas |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| | CAPÍTULO 1: ENSAIOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PELO SARS-CoV-2..... | 14 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 | O NOVO CORONAVÍRUS E A COVID-19..... | 16 |
| 2.2 | BUSCA POR FÁRMACOS NO CONTROLE DE DOENÇAS INFECCIOSAS..... | 18 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 21 |
| 3.1. | OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 22 |
| 5. | RESULTADOS..... | 23 |
| 5.1 | FÁRMACOS | 24 |
| 5.1.1 | Novos fármacos..... | 24 |
| 5.1.2 | Reposicionamento de fármacos..... | 31 |
| 5.1.2.1 | Fármacos antivirais..... | 39 |
| 5.1.2.2 | Fármacos antiparasitários e antibacterianos..... | 42 |
| 5.1.2.3 | Fármacos anti-câncer..... | 44 |
| 5.1.2.4 | Fármacos imunomoduladores..... | 45 |
| 5.1.2.5 | Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (ARBS)..... | 47 |
| 5.2 | ANTICORPOS MONOCLONAIS..... | 49 |
| 5.3 | PLASMA CONVALESCENTE..... | 51 |
| 5.4 | TERAPIA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS..... | 52 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 53 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 56 |
| | CAPÍTULO 2 – ANÁLISES IN SÍLICO DE EPÍTOPOS PROVENIENTES DA PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL DO SARS- CoV-2..... | 65 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 65 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 67 |
| 2.1 | VACINOLOGIA REVERSA..... | 67 |
| 2.2 | PROTEÍNA DE ENVELOPE..... | 68 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 69 |
| 3.1. | OBJETIVO GERAL..... | 69 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 69 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 70 |
| 4.1 | OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA CONSENSO DA PROTEÍNA ESTRUTURAL PUTATIVAS DE SARS-COV-2..... | 70 |
| 4.2 | IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS..... | 71 |
| 4.3 | PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE RECEPTOR DE CÉLULAS MHC-I OU MHC- II E B..... | 71 |
| 4.4 | ALINHAMENTO E DETERMINAÇÃO DE EPÍTOPOS DE CONSENSO MUNDIAL..... | 72 |
| 4.5 | IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS TRANSMEMBRANA..... | 72 |
| 4.6 | TESTE DE ANTIGENICIDADE, ALERGENICIDADE E PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE EPÍTOPOS SELECIONADOS..... | 72 |
| 4.7 | IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE N-GLICOSILAÇÃO..... | 73 |
| 4.8 | MODELAGEM DA PROTEÍNA ESTRUTURAL E DO SARS-COV-2..... | 73 |
| 4.9 | REFINAMENTO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E EPÍTOPOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA E DO SARS-COV-2 PARA <i>DOCKING</i> MOLECULAR..... | 73 |
| 4.10 | HLA E EPÍTOPOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DE ANCORAGEM DO SARS-COV-2..... | 74 |
| 5 | RESULTADOS..... | 75 |
| 5.1 | SEQUÊNCIA CONSENSO DA PROTEÍNA ESTRUTURAL ENVELOPE DO SARS-COV-2 DE DIFERENTES GENOMAS | 75 |
| 5.2 | IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS DA SEQUÊNCIA CONSENSO DA PROTEÍNA E DE SARS-COV-2 QUE INTERAGEM COM AS MOLÉCULAS DE MHC E BCR..... | 76 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.3 | SELEÇÃO RACIONAL DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PUTATIVOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO SARS-COV-2 INDICA PELO MENOS UM EPÍTOPO CANDIDATO NA PROTEÍNA DO ENVELOPE..... | 77 |
| 5.4 | IDENTIFICAÇÃO DA POSIÇÃO DO EPÍTOPO IMUNOGÊNICO PUTATIVO SELECIONADO DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO ENVELOPE DO SARS-COV-2 APÓS MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA..... | 78 |
| 5.5 | <i>DOCKING</i> MOLECULAR ENTRE OS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PUTATIVOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL E, MHC-I E MHC-II DO SARS-COV-2 MOSTRAM ALTAS PROBABILIDADES DE INTERAÇÃO ENTRE ELES..... | 79 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 83 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 85 |
| | REFERÊNCIAS..... | 86 |

CAPÍTULO 1: ENSAIOS CLÍNICOS DE FÁRMACOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PELO SARS-CoV-2

1 INTRODUÇÃO

O surto de infecção respiratória causado pelo β -coronavírus SARS-CoV-2 teve início na cidade de Wuhan, província de Hubei na China em Dezembro de 2019 (LAUXMANN, *et al.* , 2020). Nomeada de COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*), pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em fevereiro de 2020, o novo coronavírus foi elevado de surto à pandemia em março de 2020 devido seu potencial de transmissibilidade causando morbidade e mortalidade significativos. Esse vírus é responsável por aproximadamente 430 milhões de casos e 5,9 milhões de mortes em todo o mundo até meados de Fevereiro de 2022 (WHO, 2020; WHO, 2022).

Por se tratar de uma emergência global de rápida evolução a pandemia de COVID-19 ainda sobrecarrega os sistemas de saúde do mundo todo com características complexas e potencial de gravidade elevados (GALLO, *et al.* , 2021).

Os sintomas da doença começam com febre e manifestações respiratórias como tosse e falta de ar e podem evoluir para perda de olfato e paladar, dor abdominal, diarreia e náuseas. Alguns indivíduos podem não apresentar sintomas e outro podem evoluir para formas mais graves necessitando até mesmo de internação em unidades de terapia intensiva (UTI) e a variação da intensidade dos sintomas pode estar relacionada a comorbidades e doenças pré existentes (ÖZCEYLAN, *et al.* , 2022).

A falta de fármacos específicos, o aumento da necessidade de terapia intensiva para os pacientes hospitalizados e o agravamento de quadros clínicos fez com que o mundo todo buscasse terapias eficazes para o tratamento da COVID-19 (FERREIRA e ANDRICOPULO, 2020).

A eficácia de medicamentos já existentes também tem sido amplamente explorada e até meados de 2021 foram contabilizados pelo ClinicalTrials.gov cerca de 5.800 ensaios clínicos envolvendo diagnóstico, prevenção e tratamento da COVID-19, e esse número aumenta a cada dia. (RIBEIRO *et al.* , 2021).

O clinicaltrials.gov (www.clinicaltrials.gov) é um banco de dados de ensaios clínicos administrado pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos e foi disponibilizado em 2000 como resultado da Lei de Modernização da Food and Drug

Administration (FDA). O site oferece informações acerca de ensaios clínicos que contam com apoio público e privado sobre uma ampla gama de doenças com registros de mais de 209 países (ANAND, *et al.* , 2017).

Os fármacos envolvidos nesses estudos podem ser classificadas em: novos fármacos, fármacos de reposicionamento: antivirais, antiparasitários e antibacterianos, imunomoduladores, inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (ARBs), anticorpos monoclonais, plasma convalescente e terapia de células mesenquimais e são divididas em dois grupos, onde um deles tem como alvo o ciclo de replicação do vírus e o outro abordagens de imunoterapia capazes de aumentar a resposta imune inata.

Entre os novos fármacos, pode-se destacar como os mais promissores: O pró-fármaco de fosfato projetado PF-07304814 (HALFORD, 2020), DFV890 desenvolvido pela Novartis para o tratamento de pneumonia e função respiratória prejudicada (AG, N. P., 2020), RBT-9 desenvolvido pela Renibus Therapeutics como um antiviral (RUIZ *et al.* , 2020) e TD-0903 que por meio de seu mecanismo tem o potencial de inibir amplamente a sinalização dos transdutores de Janus quinase / sinal e ativadores da transcrição (JAK-STAT) nas vias aéreas, bloqueando a liberação de citocinas e quimiocinas que podem estar associadas a lesão pulmonar aguda e ao início de uma síndrome de tempestade de citocinas (SING *et al.* , 2021).

Sendo assim, o capítulo um da presente dissertação tratou dos ensaios clínicos em andamento para o tratamento da Covid-19, e teve como objetivo a descrição dos ensaios realizados ao redor do mundo apontando as diferentes abordagens observadas, fomentando que ensaios clínicos são uma ferramenta indispensável no que tange a pesquisa médica. O rápido desenvolvimento de novos fármacos e o reposicionamento dos já existentes são indispensáveis para haja o controle da infecção o quanto antes, porém os mecanismos de ação desses medicamentos precisam ser elucidados e discutidos.

Já a segunda parte desta dissertação baseia-se na busca de um epítipo imunestimulante da proteína do envelope viral e será tratada no capítulo dois.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

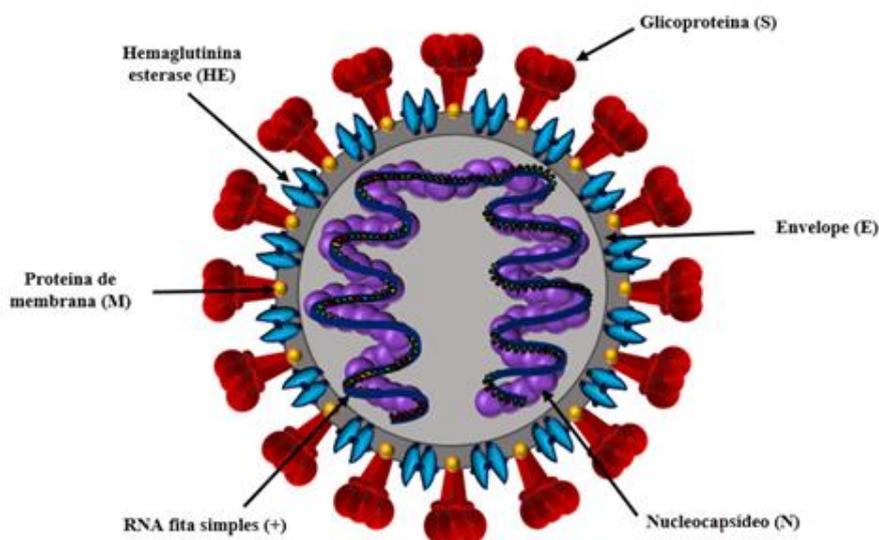
2.1 O NOVO CORONAVÍRUS E A COVID-19

Os Coronavírus (CoVs) são os vírus de RNA de fita simples positiva classificados taxonomicamente sob a família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae* (que pode ser dividida em quatro gêneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* e *Deltacoronavirus*). Embora sejam conhecidos a muitos anos, os coronavírus costumavam ser responsáveis por doenças respiratórias leves até o início do século XXI quando se tornaram uma ameaça, afetando vidas humanas em 2002 e 2012 com os SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente (KADAM *et al.* , 2021).

Após o aparecimento de pacientes com sintomas de pneumonia de causa desconhecida em Dezembro de 2019 em Wuhan, amostras de lavado broncoalveolar foram coletadas, analisadas e testadas para 22 patógenos incluindo vírus e bactérias e através de reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) detectou-se o RNA viral, sendo possível então se isolar um novo coronavírus denominado 2019-nCoV, sendo este o sétimo membro da família dos coronavírus responsável por infectar humanos (ZHU *et al.* , 2020).

O SARS-CoV-2 tem um genoma de 29,9 kilobases (kb) e diferentes componentes (Figura 1) sendo eles quatro proteínas estruturais: glicoproteínas spike, membrana, nucleocapsídeo, envelope e o dímero hemaglutinina-esterase, além de dezesseis proteínas não estruturais ou acessórias nomeadas de nsp1 a nsp16 (WANG *et al.* , 2020).

Figura 1- Estrutura da partícula viral do SARS- CoV-2 onde o RNA viral se localiza no interior da partícula associado a proteína do nucleocapsídeo (N) (em roxo). As proteínas de membrana (M) (em amarelo), glicoproteínas (S) (em vermelho) e as proteínas hemaglutinina esterase (HE) (em azul) localizam- se na superfície do Envelope (E) (em cinza)



Fonte: PEREIRA, 2021.

Com o genoma similar ao de outros membros da família como o SARS- CoV e BatCoV RaTG13, o SARS-CoV-2 possui pelo menos dez quadros de leitura aberta (*Open Reading Frames- ORFs*). Responsáveis pela produção de proteínas de replicação as ORFs (5') compreendem cerca de dois terços da sua carga genética (Chan JF *et al.* , 2020). Já a sequência compreendida na porção 3' está envolvida na codificação das proteínas estruturais (Li X *et al.* , 2020).

A interação ligante-receptor onde a glicoproteína S se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (*Angiotensin- converting enzyme 2- ACE 2*) faz com que haja o início da infecção através da clivagem da glicoproteína de pico que é realizada por proteases da célula permitindo a entrada do vírus através do processo de adsorção, ou seja, o contato inicial célula-vírus (Li W *et al.* , 2003).

A enzima conversora de angiotensina 2 atua como um receptor na superfície celular onde o SARS-CoV-2 entra na célula hospedeira e é altamente expresso nos pulmões, rins e coração e posteriormente liberado no plasma. O vírus causa uma interrupção no equilíbrio entre a enzima conversora de angiotensina, a enzima conversora de angiotensina 2 e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona fazendo com que haja progressão da doença. Contudo a expressão de ACE2 pode ser contraditória já que pode auxiliar na patogenicidade do SARS-CoV-2 mas inversamente limitar a infecção (BEYERSTEDT *et al.* , 2021).

Os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentavam, desde o início dos casos, sintomas similares aos de doenças respiratórias com progressão para pneumonia o que sugeria que o pulmão fosse o tropismo primário do vírus, que entra no hospedeiro através do trato respiratório, vias aéreas e células epiteliais alveolares, sendo as células endoteliais vasculares e os macrófagos alveolares os primeiros alvos da entrada viral (HARRISON *et al.* , 2020).

Os sintomas da doença fomentam que a transmissão ocorre principalmente por via respiratória já que existe a replicação produtiva do vírus tanto no trato respiratório superior quanto inferior e sua propagação pode ser tanto sintomática quanto assintomática o que tornam o uso de máscara de proteção individual, rastreamento de contato e isolamento físico indispensáveis no controle da doença (HARRISON *et al.* , 2020).

2.2 BUSCA POR FÁRMACOS NO CONTROLE DE DOENÇAS INFECCIOSAS

As doenças infecciosas são aquelas causadas por microrganismos: vírus, fungos, bactérias ou parasitas com potencial patogênico que podem estar presentes no organismo do indivíduo de forma equilibrada, sem causar danos e que após uma alteração no sistema imune podem proliferar de forma desordenada e facilitar a entrada de outros microrganismos que invadem a célula do hospedeiro para que possam se replicar e causar danos (LIBERTUCCI *et al.* , 2020).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas envolve um complexo processo que inclui tempo e muito dinheiro, fazendo com que as indústrias farmacêuticas não consigam balancear produção e custos com pesquisa (VILLALBA, 2015).

O desenvolvimento de novos fármacos está intrinsecamente ligado a inovações científicas, sendo a biologia molecular de fundamental importância nesse processo constituindo as bases de entendimento de pontos como potência, afinidade e seletividade (VILLALBA, 2015).

O processo, geralmente lento, se divide em três fases, sendo elas: descoberta ou fase pré-clínica, desenvolvimento ou fase clínica e registro do fármaco (BRANCO *et al.*, 2012).

Entre os fármacos desenvolvidos para doenças infecciosas pode-se destacar os para tratamento da tuberculose, doença que foi por anos considerada negligenciada já que costumava acometer países subdesenvolvidos e seu tratamento não despertava interesse na indústria farmacêutica já que as vendas de medicamentos não trariam retorno significativo e não cobririam os gastos da pesquisa (BRANCO *et al.*, 2012).

O passo inicial para o desenvolvimento de novos fármacos para tuberculose baseia-se na atividade antimicobacteriana de uma molécula através de planejamento molecular ou triagem, passando por otimização estrutural para obtenção de compostos mais ativos ou com menor toxicidade (NG, R. 2015).

Ainda na fase pré-clínica são realizadas análises *in vivo* e *in vitro* para que então possa concluir-se se o fármaco está qualificado a seguir para a fase clínica, realizada com seres humanos, de forma voluntária divididas em 3 fases a fim de determinar segurança, tolerância, eficácia, farmacocinética, dosagem e esquema terapêutico (NG, R. 2015).

Com isso o reposicionamento de fármacos, que é utilizado para definir novas indicações terapêuticas para medicamentos já aprovados, tem ganhado destaque e atenção já que apresenta muitas vantagens em relação à pesquisa de produção de novos medicamentos, inclusive a redução de riscos no processo de produção (KUNDU *et al.*, 2015).

O reposicionamento implica na pesquisa e identificação dos compostos do alvo, autorização de utilização do composto, fase de desenvolvimento que pode iniciar-se já diretamente nos ensaios clínicos e na farmacovigilância pós comercialização, levando menos tempo no desenvolvimento e disponibilização mais rápida a população (VALE, 2019).

Os fármacos a serem reposicionados dividem-se em três grupos: os genéricos, não protegidos por patentes; medicamentos que não entraram no mercado por não apresentarem eficácia nos ensaios clínicos e medicamentos patenteados ou na última fase do desenvolvimento clínico (VALE, 2019).

A identificação de candidatos se dá a partir da necessidade da pesquisa de um composto para uma determinada indicação que já possua um nível de segurança importante e um perfil comercial factível. Com o avanço do número de casos de Covid-19, potenciais alvos terapêuticos e fármacos começaram a ser relatados e estudos para novos fármacos e reposicionamento foram impulsionados e estão passando por extensas pesquisas, incluindo remdesivir e cloroquina (FAN *et al.* , 2020).

A longo prazo espera-se que os estudos realizados levem ao desenvolvimento de fármacos que produzam efeitos terapêuticos de amplo espectro e possam atuar não somente no combate ao SARS-CoV-2 mas em diferentes coronavírus (FAN *et al.* , 2020).

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento dos ensaios clínicos de fármacos e reposicionamento fármacos para o tratamento da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos do presente capítulo:

- a) obter os dados provenientes dos ensaios clínicos em desenvolvimento para o desenvolvimento de novos fármacos ou reposicionamento de fármacos no tratamento da COVID-19;
- b) identificar os modos de ação dos novos fármacos ou reposicionamento de fármacos no tratamento da COVID-19 nos ensaios clínicos em desenvolvimento;
- c) apontar nos ensaios clínicos selecionados os diversos estudos com imunobiológicos no tratamento, na prevenção ou no diagnóstico da COVID-19.

4 METODOLOGIA

A busca de dados dos ensaios clínicos em desenvolvimento foi baseada no banco de dados Clinical Trials.Gov (www.clinicaltrials.gov), um recurso da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA que oferece informações sobre ensaios clínicos e estudos observacionais com suporte público e privado acerca de uma ampla gama de doenças, como mostrado na figura 2.

Descritores específicos para cada busca foram utilizados, sendo o termo “Covid-19” utilizado no campo de “condições ou doença de interesse” para todas as buscas e os termos “*drugs*”, “*other drugs*”, “*antiviral drugs*”, “*anti cancer drugs*” e “*antiparasitic drugs*” no campo “outros termos”.

Não houveram restrições de idiomas, condições da doença, resultados ou locais.

Os critérios de elegibilidade se basearam em: conter um número de identificador de base do clinicaltrials.gov, descrever o número de participantes, período de estudo e país de estudo.

Vale ressaltar que o presente estudo utilizou apenas ensaios clínicos listados no banco do Clinical Trials.

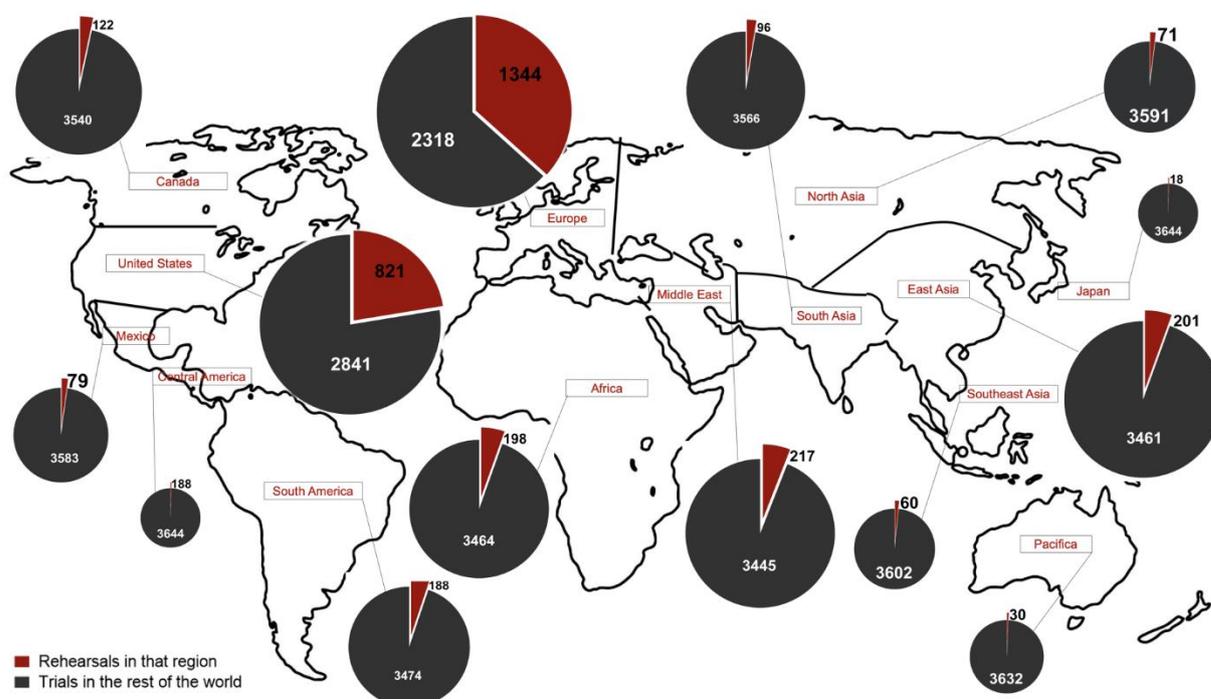
Figura 2- *Pipeline* da metodologia da busca de dados



5 RESULTADOS

Em ClinicalTrials.gov (www.clinicaltrials.gov), foram encontrados 3.743 ensaios clínicos que avaliaram fármacos no tratamento de COVID-19 de Fevereiro de 2021 até Fevereiro de 2022. A maioria desses ensaios clínicos são conduzidos em países da Europa e nos Estados Unidos, perfazendo mais de 50% quando comparados ao total de ensaios (Figura 3).

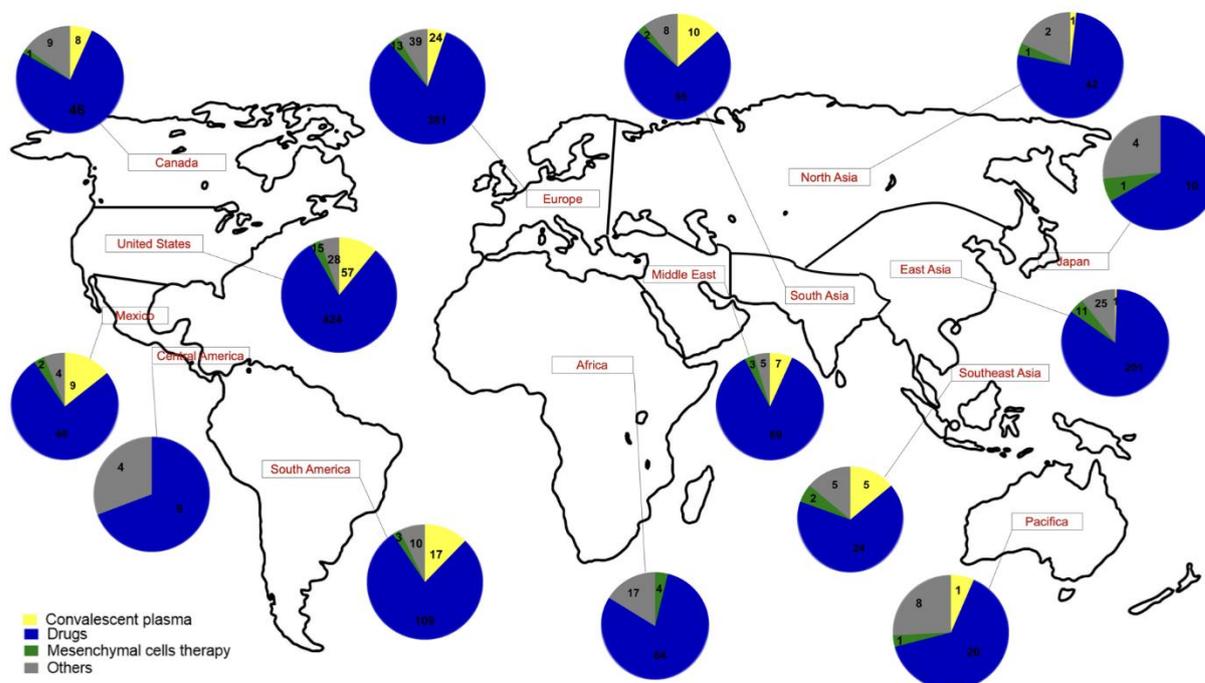
Figura 3- Total dos ensaios clínicos em todo o mundo



Fonte: da autora, 2021.

Quanto ao tipo de ensaio clínico, a maioria envolve avaliação de fármacos e medicamentos biológicos (como vacinas e plasma convalescente) e, em menor número, terapias celulares, ventilação mecânica, testes diagnósticos e telemedicina (aqui descritos como outros) (Figura 4).

Figura 4- Ensaios clínicos para COVID-19 em todo o mundo. Diferentes círculos representam tipos de ensaios clínicos em cada parte do mundo. Quanto ao uso de plasma convalescente (em amarelo), avaliação de fármacos (em azul), uso de terapia com células mesenquimais (em verde) e outros (em cinza)



Fonte: da autora, 2021.

5.1 FÁRMACOS

Além de desenvolver novas opções de tratamento, como novos medicamentos, imunoterapias e terapias dirigidas ao hospedeiro, os cientistas em todo o mundo continuam a explorar simultaneamente a eficácia dos medicamentos já existentes contra a SARS-CoV-2 (JEAN, 2020).

Esses fármacos podem ser divididos em duas grandes categorias: aquelas que podem ter como alvo direto o ciclo de replicação do vírus e aquelas baseadas em abordagens de imunoterapia destinadas a aumentar as respostas imunes antivirais inatas ou aliviar os danos induzidos por respostas inflamatórias desreguladas.

5.1.1. Novos fármacos

Os novos medicamentos para COVID-19 considerados são aqueles que não estavam previamente associados a estudos de outras doenças e estão descritos na Tabela 1.

Quadro 1- Novos Fármacos

(Continua)

| Fármaco | Categoria do fármaco | Título do estudo | Patrocinadores | Fase | Número NCT | Locais |
|-------------|---|--|----------------------------|--------|-------------|---|
| DFV890 | Antiviral | Study of Efficacy and Safety of DV890 in Patients With COVID-19 Pneumonia. | Pfizer | Fase 2 | NCT04382053 | Argentina, Brasil, Dinamarca, Alemanha, Holanda, Peru, Federação Russa, África do Sul e Espanha |
| PF-07304814 | Antiviral | First-In-Human Study To Evaluate Safety, Tolerability, And Pharmacokinetics Following Single Ascending Dose And Extended Infusion of PF 07304814 In Hospitalized Participants With COVID-19. | Novartis | Fase 1 | NCT04535167 | Estados Unidos da América |
| RBT-9 | Antiviral e imunomodulador | A Study to Evaluate the Effect of RBT-9 on Progression of COVID-19 in High-Risk Individuals (The PREVENT Study). | Renibus Therapeutics, Inc. | Fase 2 | NCT04364763 | Estados Unidos da América |
| SAR443122 | Imunomodulador (inibidor RIPK1) | A Phase 1b Trial to Evaluate Safety and Effect of SAR443122 on Immune System in Severe COVID-19. | Sanofi | Fase 1 | NCT04469621 | Argentina, Brasil, Chile, México e Federação Russa. |
| TD-0903 | Imunomodulador (inibição de JAK) desenvolvido para o tratamento de lesão pulmonar aguda devido a COVID-19 | TD-0903 for ALI Associated With COVID-19. | Theravance Biopharma | Fase 2 | NCT04402866 | República da Moldávia, Romênia, Ucrânia e Reino Unido |
| RLS-0071 | Imunomodulador. Novo peptídeo desenvolvido para o tratamento de lesão pulmonar aguda devido a COVID-19 | A Study of RLS-0071 in Patients With Acute Lung Injury Due to COVID-19 Pneumonia in Early Respiratory Failure. | ReAlta Life Sciences, Inc. | Fase 1 | NCT04574869 | Estados Unidos da América |

Quadro 1- Novos Fármacos

(Conclusão)

| Fármaco | Categoria do Fármaco | Título do estudo | Patrocinadores | Fase | Número NCT | Locais |
|------------------|--|--|---|---------------|-------------|---|
| M5049 | Imunomodulador. Um novo inibidor potente e seletivo de receptores toll-like 7 e 8 | M5049 Study in Participants With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia. | EMD Serono Research & Development Institute, Inc. | Fase 2 | NCT04448756 | Brasil and Estados Unidos da América |
| EG-HPCP-03a | Desconhecido* | Study to Evaluate the Efficacy and Safety of EG-HPCP-03a Compared to DEX in Patients With COVID-19 Pneumonia. | Evergreen Therapeutics, Inc. | Fase 2 | NCT04561180 | Desconhecido* |
| COVID19-0001-USR | Desconhecido* | Study to Evaluate the Efficacy of COVID19-0001-USR in Patients With Mild/or Moderate COVID-19 Infection in Outpatient. | United Medical Specialties | Fase 1/2 | NCT04595136 | Colômbia |
| PHR160 Spray | Desconhecido* | Safety and Efficacy of PHR 160 Spray on the Outcomes of Patients With COVID-19. | Baqiyatallah Medical Sciences University | Não se aplica | NCT04463420 | Irã (Republica Islâmica do Irã) |
| BLD-2660 | Desconhecido* | Safety and Antiviral Activity of BLD-2660 in COVID-19 Hospitalized Subjects. | Blade Therapeutics and Clinipace Worldwide | Fase 2 | NCT04334460 | Califórnia, Distrito de Columbia, Flórida, Idaho, Illinois, Iowa, Kentucky, Carolina do Norte, Pensilvânia, Carolina do Sul, Tennessee, Texas, Washington, Brasil |
| SNG001 | Antiviral | Trial of Inhaled Anti-viral (SNG001) for SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection | Synaigen Research Ltd. | Fase 2 | NCT04385095 | Reino Unido |

Fonte: da autora, 2021.

Legenda: Desconhecido* nenhuma informação foi encontrada .

Destes novos fármacos, alguns apresentaram resultados promissores nos ensaios clínicos em desenvolvimento como os PF-07304814, DFV890, RBT-9, TD-0903, M5049, BLD-2660 e SNG001, e serão descritos abaixo.

PF-07304814: Com três estudos, sendo dois concluídos e um ativo com previsão de finalização para Julho de 2022, o pró-fármaco de fosfato projetado PF-07304814 é metabolizado em PF-00835231, que é um potente inibidor *in vitro* da protease 3CL SARS-CoV-2 em estudos pré-clínicos (Figura 5) (BORAS *et al.*, 2020; DE VRIAS *et al.*, 2020) PF-00835231 exibe potente atividade antiviral *in vitro* contra SARS-CoV-2 como um agente único. É aditivo /sinérgico em combinação com o remdesivir e pode ser mais potente do que o remdesivir (BORAS *et al.*, 2020; DE VRIAS *et al.*, 2020). Este medicamento foi desenvolvido pela Pfizer e está sendo avaliado em ensaios clínicos de fase 1 (ensaio clínico número NCT04535167) sendo um estudo randomizado, duplo-cego, aberto pelo patrocinador, controlado por placebo, de dose única e múltipla em adultos saudáveis, avaliando a segurança, tolerabilidade e farmacocinética do PF-07321332 em hospitais nos EUA (NLM, 2020).

DFV890: Medicamento desenvolvido pela Novartis, e a eficácia e segurança de DFV890 para o tratamento de pacientes COVID-19 com pneumonia e função respiratória prejudicada está sendo avaliada em ensaios clínicos de fase 2 (NCT04382053). Os ensaios clínicos envolvem pacientes de 12 países diferentes: Argentina, Brasil, Dinamarca, Alemanha, Hungria, Índia, México, Holanda, Peru, Federação Russa, África do Sul e Espanha. (Status de recrutamento: concluído). Os resultados não foram disponibilizados por haver acordo de confidencialidade (NLM, 2020).

RBT-9: Este medicamento está sendo desenvolvido pela Renibus Therapeutics como um antiviral com características protetoras de órgãos. A Renibus Therapeutics conduziu ensaios de fase 2 deste composto com atividade antiviral e imunomoduladora para avaliar a eficácia, tolerabilidade e segurança de uma única dose de RBT-9 versus placebo na infecção por COVID-19 em adultos não criticamente enfermos que estão em alto risco de progressão (NCT04364763) (NLM, 2020). O

estudo foi finalizado em Setembro de 2021 mas os resultados ainda não foram disponibilizados.

TD-0903: Este medicamento é um inibidor pan-JAK seletivo para o pulmão, que foi descoberto e desenvolvido pela Theravance Biopharma para o tratamento de lesão pulmonar aguda associada a COVID-19. Por meio de seu mecanismo, o TD-0903 tem o potencial de inibir amplamente a sinalização dos transdutores Janus quinase / sinal e ativadores da transcrição (JAK-STAT) nas vias aéreas, bloqueando a liberação de citocinas e quimiocinas que podem estar associadas a lesão pulmonar aguda e ao início de uma síndrome de tempestade de citocinas (Figura 5). Estudos pré-clínicos sugerem que o TD-0903 tem uma razão pulmão-plasma muito alta e rápida depuração metabólica, resultando em baixa exposição sistêmica, o que é compatível com sua seletividade pulmonar. O TD-0903 é administrado por meio de uma solução inalatória nebulizada, o que aumenta ainda mais a seletividade pulmonar. Estudos pré-clínicos farmacodinâmicos indicam que TD-0903 tem uma duração de ação estendida que deve permitir uma ou duas doses diárias em humanos. (3 estudos, ambos com status de recrutamento = concluído. Dois em fase 1 (NCT04350736)/ (NCT05091723) e outro em fase 2 (NCT04402866) (NLM, 2020).

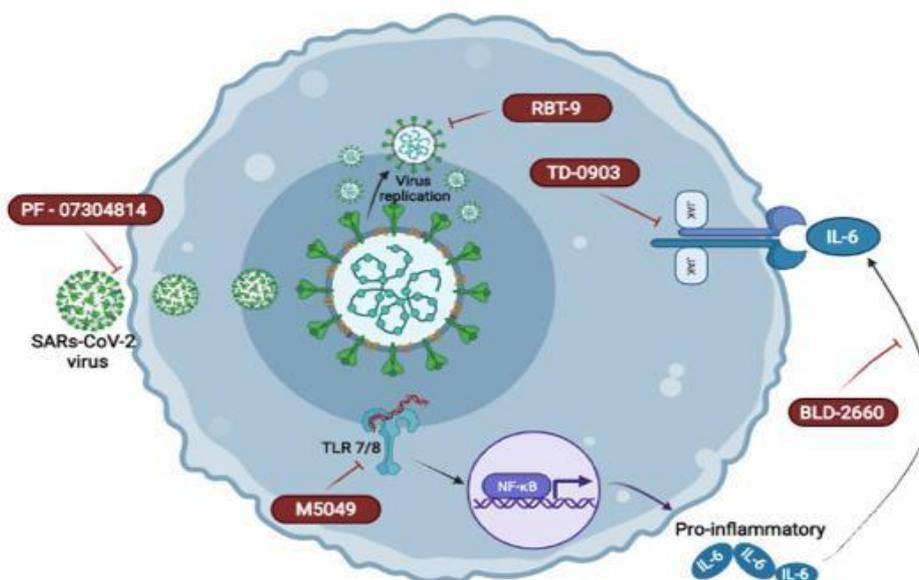
M5049: Este medicamento é uma pequena molécula potencial primeira da classe que bloqueia a ativação do receptor Toll-like (TLR) 7 e TLR8, (Figura 5) que são dois sensores imunes inatos que detectam RNA de fita simples de vírus como o SARS-CoV -2. A ativação de TLR7 / 8 leva à ativação e inflamação das células imunes, que, quando não controladas adequadamente, podem causar imunopatologia grave. A Merck iniciou um estudo clínico controlado randomizado de fase 2 (NCT04448756) avaliando a segurança e eficácia de M5049 com o objetivo de prevenir ou melhorar a resposta hiperinflamatória e prevenir a progressão para síndrome de tempestade de citocinas em pacientes com COVID-19 (NLM, 2020).

BLD-2660: Este medicamento é um novo inibidor de pequenas moléculas sintéticas, oralmente ativo, da calpaína 1, 2 e 9, seletivo sobre as catepsinas e também sobre outras famílias de proteases (Figura 5). Apresenta boa estabilidade metabólica e permeabilidade, biodisponibilidade oral e baixa inibição do citocromo P450. Ele está

em desenvolvimento para o tratamento de pacientes com COVID-19 em ensaios clínicos de fase 2 nos hospitais dos EUA e do Brasil (NCT04334460). Os resultados ainda não foram disponibilizados pois estão em revisão (NLM, 2020).

SNG001: Este é um medicamento inalatório que contém uma proteína antiviral chamada interferon beta (IFN- β). Muitos vírus inibem o IFN- β como parte de sua estratégia para escapar do sistema imunológico. O IFN- β protege as células contra os coronavírus MERS e SARS. Existem quatro estudos abordando essa droga. Sendo e na fase 3 (NCT04732949)/ (NCT05207293) 1 na fase 2 (NCT04385095) e 1 na fase 2/3 (NCT04518410) (NLM, 2020).

Figura 5- Mecanismo de ação de novos medicamentos



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: Resultados promissores de novos medicamentos contra o novo coronavírus. PF-07304814 atua bloqueando a protease SARS-CoV-2 3CL, prevenindo a infecção celular. O RBT-9 é um medicamento antiviral que bloqueia a replicação do vírus. TD-0903 bloqueia a sinalização JAK-STAT mediada por tempestade de citocinas, evitando danos causados pela exacerbação da resposta pró-inflamatória no pulmão. M5049 é um antagonista de TLR7 / 8 que pode reconhecer o RNA viral e estimular a resposta imune inata com o aumento da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6. O uso de M5049 ajuda a criar citocinas pró-inflamatórias ao prevenir o dano inflamatório causado pela infecção. BLD-2660 bloqueia a ação da IL-6 durante a tempestade de citocinas causada pelo novo coronavírus.

No início de 2022 as atenções foram voltadas para dois novos fármacos, o Paxlovid (combinação de PF-07321332 e Ritonavir) da Pfizer que está com um estudo em andamento no Clinical Trials.gov (NCT05263908) e está em fase de recrutamento. O Paxlovid é uma terapia antiviral inibidora da protease do SARS-CoV-2, projetada para administração por via oral, que mostrou reduzir o risco de hospitalização até o momento em cerca de 89% (WEN *et al.*, 2022).

O Molnupiravir da Merck Sharp & Dome conta com oito ensaios clínicos na biblioteca do Clinical Trials.gov: NCT04392219 fase1, NCT04746183 fase 1/2, NCT04405570/ NCT04405739 fase 2, NCT04575584/ NCT04575597 fase 2/3, NCT04939428/ NCT05195060 fase 3. O Molnupiravir é um inibidor de RdRp oralmente ativo com perfil farmacocinético favorável, com capacidade de inibir a replicação do SARS-COV-2, reduzir a carga viral e auxiliar na recuperação rapidamente (WEN *et al.*, 2022).

5.1.2 Reposicionamento de fármacos

As pandemias, como a pandemia da COVID-19, criam desafios únicos para os profissionais de saúde, como a seleção de tratamentos adequados e a falta de tempo disponível para a descoberta de medicamentos (FERREIRA *et al.*, 2020). A maioria dos ensaios clínicos avalia o reposicionamento de fármacos para controlar a infecção viral por meio de antivirais ou outros medicamentos de efeito semelhante, como antiparasitários e antibacterianos. Além disso, existem vários ensaios clínicos que avaliam anti-inflamatórios, antineoplásicos, antioxidantes, suplementos alimentares e medicamentos relacionados a doenças cardiovasculares, glicemia e lipídios como demonstrado na Tabela 2.

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | Fármacos |
|--|---|
| Adrenoleucodistrofia | OP-101 |
| Hepatite alcoólica | DUR-928 |
| Alcoolismo | Disulfiram, Naltrexona |
| Angina | T89 ou Dantonic |
| Angioedema Antiarrítmico | Ruconest, ISIS 721744 Amiodarona, Verapamil |
| Antibacteriano | Azitromicina, Amoxicilina / Clavulanato, Carrimycin, ceftriaxona, cetilpiridínio cloreto, gluconato de clorexidina, claritromicina, clindamicina, clofazimina, Peróxido de Hidrogênio, doxiciclina, tazobactam, povidona-iodo a 2%, sulfametoxazol, timerosal, Trimetoprim |
| Anticancerogênico / antineoplásico | Maleato de abivertinibe, acalabrutinibe, dimesilato de apilimode, antroquinonol, bevacizumabe, brequinar, bicalutamida, colágeno-polivinilpirrolidona, decitabina, degarelix, dociparastato de sódio, dutasterida, duvelinibolibreína, metaposida, , Plitidepsina, Proxalutamida, Ruxolitinibe, Selinexor, Tamoxifeno, Crocetinato de Sódio Trans, Toremifeno, Zanubrutinibe, AVM0703, BDB-001, INC424, EC-18, INB03, GC4419, MPT0B640, NOX66, TAK295, TAK295, -111 |
| Antiemético | Tradipitant |
| Anti-hiperglicêmico | Dapagliflozina, Icosapent etil, Linagliptina, Metformina, Pioglitazona, Sitagliptina, AZD1656 |
| Anti-hipertensivo | Anlodipina, Captopril, Ifenprodil, Losartan, Prazosina, Cloridrato de Propranolol, Telmisartan, Valsartan |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | Fármacos |
|--|---|
| Anti-enxaqueca | Zavegepant |
| Antiparasitário | Artemisinina, Atovaquona, Cloroquina / Hidroxicloroquina, Ivermectina, Levamisol, Mefloquina, Niclosamida, Nitazoxanida, Primaquina, Pironaridina-Artesunato, Quinina, Tafenoquina |
| Antiviral | Atazanavir, Azvudine, Cenicriviroc, clevudine, cobicistat, Daclatasvir, Danoprevir, darunavir, Emtricitabina, Favipiravir, Galidesivir, isoprinosina, ledipasvir, lopinavir, maraviroc, merimepodib, Molnupiravir ou MK-4482 ou EIDD-2801, oseltamivir, Remdesivir, Ribavirina, Rintatolimod, Ritonavir, Sofosbuvir, Triazavirina, Umifenovir, Ritonavir, Tenofovir disoproxil, ASC09F, AT-527, DAS181, XC221 |
| Doenças sanguíneas | Anticoagulação / antitrombótica / antiagregante Alteplase, Apixaban, Aspirina, Bemiparina, Clopidogrel, Diosmina, Dipyridamol, Dalteparina, Edoxaban, Enoxaparina, Fondaparinux, Heparina, Mesilato de Nafamostat, Prasugrel, Rivaroxaban, Tenecteplase, Tinzaparin, Trifexamida |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | | Fármacos |
|--|--|---|
| Doenças sanguíneas | Anti-trombocitopenia | Eltrombopag, rhTPO |
| | Antifibrinolítico | Aprotinina |
| | Anemia | Crizanlizumab, Desidustat, Protoporfirina e Sulfonatoporfirina, Senicapoc |
| | Sobrecarga crônica de ferro | Deferoxamina |
| Colesterol | | Atorvastatina, Rosuvastatina, Sinvastatina |
| Regulador epigenético | | NuSepin, DUR-928 |
| Retenção de líquidos | | Espironolactona |
| Suplemento alimentar | | N-acetil cisteína, Omega 3, Prolectina-M, Vitamina C, Vitamina D, Vitamina E, Zinco |
| Problemas gastrointestinais | Inibidor da secreção de ácido gástrico | Famotidina |
| | Pancreatite | TAK-671 |
| | Probiótico | Probiorinse, Omnibiotic |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | Fármacos |
|--|--|
| Terapia gênica | DeltaRex-G, Avdoralimabe, Axatilimabe, Brometo de azoxímero, Bardoxolona, Calciferol, Colágeno-Polivinilpirrolidona, Mesilato de Camostat, Ciclosporina, Dapansutrila, Emapalumabe, Fostamatinibe, Meplazumabe, Molgramostim, Monalizumabe, Tinumabizina, Nangibotida, Nangibotídeo 9, AMY-101, BDB-001, CERC-002, VIB7734 |
| Imunomodulador | <p data-bbox="763 785 2007 880">Corticosteróide Budesonida, ciclesonida, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, oftamesona, prednisona</p> |
| | <p data-bbox="763 922 2007 1024">Anti-inflamatório Astegolimab, Colchicina, Icatibant, Ibudilast, Ibuprofeno, Isotretinoína, Losmapimod, ABX464, EDP1867, GLS-1027, SAR443122</p> |
| | <p data-bbox="763 1088 2007 1145">Anti-inflamatório e antioxidante Ebselen, Fisetin, Silymarin</p> |
| | <p data-bbox="763 1184 2007 1353">Anti-inflamatórios usados contra a artrite reumatóide Abatacepte, Anakinra, Apremilast, Baricitinibe, Bucilamina, Canacinumabe, Clazakizumabe, Leflunomida, Otilimabe, Sarilumabe, Tocilizumabe, Tofacitinibe, PF-06650833</p> |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | Fármacos |
|---|--|
| Imunomodulador | Ácido acetilsalicílico, Naproxeno, Indometacina |
| Anti-inflamatório não esteroide, inibidor das ciclooxigenases 1 e 2 | |
| Bloqueador dos canais de cálcio com efeitos antiinflamatórios | Tetrandrina |
| Síndrome metabólica | Treamid Acalabrutinib, Astegolimab, Avdoralimab, Axatilimab, Canacinumab, Clazakizumab, Crizanlizumab, Duvelisib, eculizumab, Emapalumab, Gimsilumab, Garadacimab, infliximab, Itolizumab, Lanadelumab, Lenzilumab, Leronlimab, Levilimab, Mavrilimumab, Meplazumab, Monalizumab, Nivolumab, Olokizumab, Otilimab, Pamrevlumab, Ravulizumab, Risankizumab, Sarilumab, Secukinumab, Siltuximab, Sirukumab, Tocilizumab, AK119, BGB-DXP593, BMS-986253, BRIL-196, BRIL-198, CERC-002, CPI-006, CT-P59, CSL324, IC14 (Anti-CD14), JS016, LY3127804, MAS825, REGN10933 + REGN10987, SCTA01, STI-1499 (COVI-GUARD), STI-2020 (COVI-AMG™), TJ003234, TY027, VIR-7831. |
| Anticorpos monoclonais | |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(continua)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | | Fármacos |
|--|-----------------------|--|
| Desordens naturais | Mal de Parkinson | RTB101 |
| | Esclerose múltipla | Fingolimod, NBT-NM108, IMU-838 |
| | Sinusite crônica | GLS-1200 |
| | Miastenia grave | Brometo de piridostigmina, zilucoplan |
| | Anti-psicótico | Clorpromazina, Valproato / Quetiapina |
| | Antidepressivo | Brexanolona, Fluoxetina, Fluvoxamina |
| | Analgésico / sedativo | Ketamine, Dexmedetomidine, Isoflurane, Propofol, Sevoflurane, Thalidomide |
| Produto neural | Insônia | Melatonin, Ramelteon |
| | | Anis, ArtemiC, Extrato de Própolis Verde Brasileiro [EPP-AF], Cannabis / Canabidiol, Crocetina, Licorice Deglicirrizinado, Diosmina, Escina, Óleos essenciais, Glicina, Guduchi Ghan, Hesperidina, Mel, Costus Indiano, Iota-Carragenina, Isoquercetina, Celulose , Nigella sativa, Nuvastatic, Plant Polyphenol, Plitidepsin, P2Et - extrato de Caesalpinia spinosa, Quercetina, Vernonia amygdalina, Yinhu Qingwen Granula |
| Neuroprotetor | | Crocetina, Traneurocina ou NA-831, AT-001 |

Quadro 2- Reposicionamento de fármacos

(conclusão)

| Classe de fármacos ou alvo terapêutico | Fármacos |
|--|--|
| Terapia de reposição de nicotina | Adesivo de nicotina |
| Distúrbios pulmonares | Alfa-1-antitripsina, Alvelestat, Anluohuaxian, Auxora, Bromexina, Dornase Alfa, Ensifentrina, Lucinactante, Montelukaste, Nintedanibe, N-acetilcisteína, Pemziv Puliptadil, Prolastina, Alfa Poractante, Cofrota-7, BL60, LAUfota-26, LAUfota-26 MK 5475, MRx-4DP0004, PLN-74809, PUL-042, TD139, SNG001 |
| Radioprotetor | BIO 300 |
| Sarcopenia | BIO101 |
| Disfunção sexual | Aviptadil, Sildenafil |
| Vasomodulador | Almitrina, Iloprost, Pentoxifilina, Regadenoson, Sulodexida |

Fonte: da autora, 2021.

Nota: *Alguns medicamentos podem ter mais de um efeito (por exemplo, antiinflamatório e anticâncer) ou são usados para mais de uma doença listada

5.1.2.1 Fármacos antivirais

Trinta e um medicamentos foram identificados e estão envolvidos em 565 estudos desenvolvidos para infecções virais, como hepatite, HIV, Ebola, influenza, febre amarela, Zika e Chikungunya e estão sendo testados para tratar pacientes com COVID-19. Alguns medicamentos podem inibir a replicação viral (por exemplo, favipiravir, remdesivir e ribavirina) ou inibir a entrada viral (por exemplo, lopinavir-ritonavir e umifenovir) (SINGH *et al.* , 2020).

Remdesivir foi desenvolvido para o tratamento de vírus baseados em RNA e se mostrou eficiente contra o vírus Ebola e os vírus da família Coronaviridae exemplificados por MERS e SARS (EASTMAN *et al.* , 2020; SHEAHAN *et al.* , 2017). Essa droga pode ser incorporada ao RNA viral e inibir ainda mais a RNA polimerase dependente de RNA, induzindo a terminação prematura da transcrição do RNA viral (AGOSTINI *et al.* , 2018).

Estudos *in vitro* demonstraram que o remdesivir é um potente inibidor da SARS-CoV-2, o que pode justificar os ensaios clínicos em andamento com essa droga para o tratamento de COVID-19 (DE VRIES *et al.* , 2020; WANG *et al.* , 2020; CHOY *et al.* , 2020).

Grein e colaboradores (2020) observaram melhora clínica em 68% dos pacientes hospitalizados por COVID-19 grave que foram tratados com remdesivir. Outro estudo mostrou melhora clínica com remdesivir, com tempo médio de recuperação de 10 dias, em comparação com 15 dias entre aqueles que receberam placebo. Além disso, a mortalidade foi menor para os pacientes tratados com remdesivir quando comparados aos que receberam placebo (BEIGEL *et al.* , 2020).

O favipiravir inibe efetivamente a RNA polimerase dependente de RNA e a replicação viral tendo a eficácia *in vitro* contra os vírus influenza, vírus Ebola e SARS-CoV-2 descrita (FURUTA *et al.* , 2017). Em 48 ensaios clínicos o favipiravir está sendo investigado isoladamente ou em combinação com outros medicamentos para o tratamento do COVID-19.

O favipiravir demonstrou controlar parcialmente os mediadores inflamatórios em pacientes com COVID-19. No entanto, a inflamação e a tempestade de citocinas continuaram após a administração de favipiravir, que pode ser controlada com esteróides (YAMAMURA *et al.* , 2020). Cai e colaboradores (2020) conduziram um

estudo de controle aberto onde favipiravir + IFN- α exibiu depuração viral mais rápida e melhora radiológica em comparação com o grupo lopinavir / ritonavir + IFN- α .

O lopinavir, um inibidor da protease aspartato do vírus da imunodeficiência humana (HIV) tipo 1, mostrou atividade inibitória da SARS-CoV-2 in vitro (CHOY *et al.*, 2020; CHU, 2004).

Ritonavir é combinado com lopinavir para aumentar sua meia-vida plasmática por meio da inibição do citocromo P450 (CHOY *et al.*, 2020). Lopinavir / ritonavir está sendo investigado em 93 ensaios clínicos. Em seu estudo com pacientes adultos hospitalizados com COVID-19 grave, Cao e colaboradores (2020) concluíram que nenhum benefício foi observado com o tratamento com lopinavir / ritonavir. Em outro ensaio clínico aberto randomizado de fase 2 conduzido por Hung *et al.* (2020) uma combinação tripla de IFN- β -1b e lopinavir / ritonavir provou ser segura e superior a lopinavir / ritonavir, com pacientes apresentando alívio dos sintomas, duração encurtada de eliminação viral e menor tempo de internação hospitalar.

Em monoterapia, o umifenovir, que inibe a fusão da membrana do vírus influenza, demonstrou ser superior ao lopinavir / ritonavir no tratamento de COVID-19. Nenhuma carga viral foi detectada no grupo umifenovir após 14 dias da admissão, mas a carga viral foi encontrada em 44,1% dos pacientes tratados com lopinavir / ritonavir (ZHU *et al.*, 2020). Além disso, o favipiravir melhorou significativamente a latência para o alívio da pirexia e da tosse (CHEN *et al.*, 2020). A combinação de umifenovir + lopinavir / ritonavir indica uma redução mais rápida da carga viral, evitando a superestimulação do sistema imunológico, diminuindo assim a gravidade, duração e infecciosidade da doença quando comparada ao tratamento com lopinavir / ritonavir (DENG *et al.*, 2020).

A ribavirina, que geralmente é usada para o tratamento da hepatite C e é ativada pela adenosina quinase em trifosfato de ribavirina (RTP), liga-se ao local de ligação do nucleotídeo e impede a adição de nucleotídeos e também atua interrompendo a adição de 5'CAP ao mRNA viral (TE HS, JENSEN, 2020; KHALAF *et al.*, 2020) Este medicamento está sendo investigado em 18 ensaios clínicos para tratar COVID-19.

Tong e colaboradores (2020) conduziram um ensaio com pacientes COVID-19 graves, não mostrando nenhuma associação com o tempo de conversão negativo

para PCR em tempo real para o teste SARS-CoV-2 e a terapia com ribavirina não está associada à melhora da taxa de mortalidade.

Outros medicamentos anti-vírus da hepatite C, como daclatasvir e sofosbuvir, mostraram atividade antiviral *in vitro* contra SARS-CoV-2. Ambos os antivirais impediram a apoptose neuronal induzida por vírus e a liberação de mediadores inflamatórios relacionados à tempestade de citocinas, respectivamente. O daclatasvir também teve como alvo estruturas secundárias de RNA no genoma do SARS-CoV-2 (SACRAMENTO *et al.* , 2020).

O sofosbuvir está sendo investigado em 12 ensaios clínicos e o daclatasvir está sendo investigado em 10 ensaios clínicos para o tratamento de COVID-19. Eslami e colaboradores (2020) conduziram um ensaio em que pacientes graves com COVID-19 tratados com sofosbuvir / daclatasvir tiveram mortalidade mais baixa do que apenas pacientes tratados com ribavirina. Outros estudos sugeriram que sofosbuvir / daclatasvir melhora a sobrevivência e a recuperação clínica em pacientes com COVID-19 moderado a grave (SADEGHI *et al.* , 2020; ABBASPOUR *et al.* , 2020).

Alguns medicamentos experimentais desenvolvidos para outras doenças virais que ainda não foram aprovados pelos órgãos reguladores também estão sendo avaliados para o tratamento de COVID-19, como ASC09F (HIV), AT-527 (hepatite C), DAS181 (parainfluenza), XC221 (influenza) e galidesivir. Em estudos pré-clínicos, galidesivir (BCX4430) demonstrou atuar como um terminador de cadeia de RNA não obrigatório, que pode inibir polimerases de RNA viral de uma ampla gama de vírus de RNA, incluindo flavivírus (febre amarela e vírus Zika), filovírus (Ebola e Vírus de Marburg) e coronavírus (SARS-CoV e MERS-CoV) (WARREN *et al.* , 2020; JULANDER *et al.* , 2017).

A triagem virtual baseada em alvos e os resultados de *docking* molecular mostraram que o antiviral galidesivir é uma promessa contra o SARS-CoV-2, uma vez que se liga fortemente à RNA polimerase dependente de RNA (AFTAB *et al.* , 2020; ELFIKY, 2020).

Atualmente, está em fase 1 de ensaios em humanos em hospitais brasileiros para avaliar a farmacocinética, segurança e atividade antiviral do galidesivir em indivíduos com febre amarela e COVID-19 (NCT03891420).

5.1.2.2 Fármacos antiparasitários e antibacterianos

Alguns medicamentos normalmente usados como antiparasitários foram avaliados no tratamento de COVID-19, como artemisinina, atovaquona, cloroquina (difosfato de cloroquina) / hidroxicloroquina (sulfato de hidroxicloroquina), ivermectina, levamisol, mefloquina, niclosamida, nitazoxanida, primaquina, pironaridina-artesunato, quinina (YAO *et al.* ,2020).

A ivermectina é um agente antiparasitário aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) com efeitos antivirais comprovados contra o HIV, Zika e vírus da dengue (WAGSTAFF *et al.* , 2012; KETKAR *et al.* , 2019).

Células Vero / hSLAM infectadas com SARS-CoV-2 foram expostas a ivermectina 5 μ M, com redução de 93% no RNA viral presente no sobrenadante (indicativo de vírions liberados) de amostras tratadas com esta droga após 24h, e uma redução de 5000 vezes no RNA viral comparado com o controle foi encontrado após 48h (CALY *et al.* , 2020).

Os autores propuseram que a droga pode ter efeitos antivirais ao inibir o receptor α / β da importina (IMP), responsável pela transmissão de proteínas virais para o núcleo da célula hospedeira (CALY *et al.* , 2020).

Até outubro de 2021 foram encontrados oitenta ensaios clínicos avaliando esse medicamento. Embora sejam necessários ensaios clínicos randomizados para confirmar os efeitos da ivermectina no tratamento do COVID-19, um estudo envolvendo 280 pacientes mostrou menor mortalidade durante o tratamento do COVID -19 com este medicamento, especialmente em pacientes com grave envolvimento pulmonar (RAJTER *et al.* , 2020).

Outro estudo comparou a depuração viral em 400 pacientes com COVID-19 tratados com ivermectina / doxiciclina ou hidroxicloroquina / azitromicina. A depuração foi de 132 (66%) no dia 5 e 167 (83,5%) no dia 6 no grupo tratado com ivermectina, enquanto houve 154 (77,0%) depuração viral no 11º dia e 163 (81,5%) depuração viral no 12º dia da ingestão de hidroxicloroquina. Os autores concluíram que ivermectina e doxiciclina é uma combinação segura que se mostrou eficaz em termos de eliminação viral precoce em pacientes com COVID-19 leve a moderado (RAHMAN *et al.* , 2020).

Um ensaio clínico de ivermectina mais doxiciclina para o tratamento de COVID-19 mostrou menor risco de mortalidade em pacientes tratados com esses

medicamentos (NCT04523831). É importante lembrar que o FDA não aprovou a ivermectina para uso no tratamento ou prevenção de COVID-19. De acordo com as Diretrizes de Tratamento COVID-19 do National Institutes of Health (NIH), não há dados suficientes para recomendação a favor ou contra o uso de ivermectina para o tratamento de COVID-19 e mais estudos são necessários (MAHMUD, 2021).

A cloroquina e a hidroxicloroquina, que são utilizadas no tratamento da malária e doenças autoimunes (KATZ & RUSSELL, 2011), têm sido o foco de grande atenção do público (KHUROO, 2020).

Alguns estudos preliminares demonstraram que a hidroxicloroquina é eficaz na inibição da infecção por SARS-CoV-2 *in vitro*, com menos toxicidade, e é mais potente que a cloroquina (YAO *et al.*.,2020; LIU *et al.*.,2020).

No entanto, ensaios clínicos randomizados e controlados em grande escala não conseguiram demonstrar nenhum benefício de sobrevivência dessa terapia com medicamentos nessa doença (TANG *et al.*., 2020; CHEN *et al.*., 2020).

Apesar de todas essas informações, esses medicamentos estão sendo avaliados em 336 ensaios clínicos, mesmo em comparação ou em combinação com outros medicamentos. Setenta e um desses estudos analisam a combinação de hidroxicloroquina e azitromicina. Em 28 de março de 2020, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA emitiu a inclusão de cloroquina e hidroxicloroquina no tratamento de COVID-19. Posteriormente, em 15 de junho de 2020, o FDA dos EUA revogou a autorização de uso de emergência com base em sua análise em andamento. O FDA declarou ainda que ambos medicamentos não mostram nenhum benefício na mortalidade ou na recuperação rápida e, portanto, são improváveis de serem eficazes no tratamento de pacientes com COVID-19.

Em 27 de maio de 2021, o National Institutes of Health (NIH) publicou as Diretrizes de Tratamento COVID-19 com base em uma avaliação da evidência coletiva de vários estudos clínicos que não recomendam o uso desses fármacos para profilaxia ou tratamento COVID-19 porque não havia diferenças entre os grupos tratados e placebo. Além disso, houve relatos de eventos adversos após o uso desses medicamentos.

Um estudo de revisão sobre esses fármacos enfatiza a necessidade de abordagens de tratamento baseadas em evidências de grandes ensaios clínicos randomizados para enfrentar a pandemia de COVID-19 em andamento e não o mero

estudo observacional que engana o sistema público de saúde, que paralisa o mundo inteiro (MANIVANNAN *et al.* , 2021).

Outro antiparasitário de amplo espectro, a nitazoxanida, mostrou atividade antiviral contra MERS-CoV com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-2, IL-6 e IL-8 (ROSSIGNOL, 2016).

Uma revisão recente avaliou nove ensaios clínicos com nitazoxanida, concluindo que este medicamento demonstra um bom perfil de segurança nas doses aprovadas; embora, evidências adicionais sejam necessárias em relação aos efeitos hepatorenais e cardiovasculares, bem como à teratogenicidade (LIRA *et al.* , 2021).

Existiam 29 ensaios clínicos com nitazoxanida em andamento em todo o mundo até outubro de 2021. Um estudo recente mostrou que 78% e 57% dos pacientes nos grupos nitazoxanida e placebo, respectivamente, relataram resolução completa dos sintomas em 1 semana de acompanhamento. A carga viral também foi reduzida após o tratamento com nitazoxanida em comparação com o placebo, e nenhum evento adverso sério foi observado (ROCCO *et al.* , 2020).

5.1.2.3 Fármacos anti-câncer

Originalmente desenvolvido para o tratamento do câncer, opaganibe, um inibidor seletivo da esfingosina quinase-2 (SK2), é considerado um antiinflamatório e um potencial antiviral para COVID-19 (EL BAIRI *et al.* , 2021).

Este medicamento demonstrou potente atividade anti-SARS-CoV-2, alcançando o bloqueio completo da replicação viral em um modelo in vitro de tecido pulmonar humano. Em uma pequena coorte de pacientes graves com COVID-19, o opaganibe foi seguro e bem tolerado, com melhora demonstrada nos parâmetros clínicos e laboratoriais em todos os pacientes tratados (KURD *et al.* , 2020). Foram encontrados quatro ensaios clínicos avaliando esta droga no tratamento de COVID-19, e um desses ensaios está na fase 2/3.

De acordo com os pesquisadores, DeltaRex-G, outra droga anticâncer, é a primeira e, até agora, a única terapia genética direcionada à doença que tem o potencial de tratar efetivamente a tempestade de citocinas induzida por COVID-19 e a síndrome do desconforto respiratório. A hipótese é que o DeltaRex-G pode acelerar a recuperação da pneumonia e prevenir a doença pulmonar crônica, matando as

células imunes ativadas que causam a síndrome do desconforto respiratório agudo e os fibroblastos proliferativos que causam a doença pulmonar crônica (SOHEILI *et al.* , 2021). Este medicamento foi investigado em um ensaio clínico de fase 1/2 (NCT04378244).

5.1.2.4 Fármacos imunomoduladores

Esses fármacos são baseados em abordagens de imunoterapia destinadas a aumentar as respostas imunes antivirais inatas ou aliviar os danos induzidos por respostas inflamatórias desreguladas. Corticosteroides, antiinflamatórios, antineoplásicos, anticorpos monoclonais e até suplementos alimentares e produtos de origem natural estão sendo avaliados para o tratamento do COVID-19 (Tabela 2) (JEAN *et al.* , 2020).

O uso de glicocorticóides sistêmicos foi discutido na infecção por SARS-CoV-2, uma vez que eles podem prolongar a depuração viral. No entanto, também se sabe que a patogênese subjacente da pneumonia por COVID-19 é composta tanto pelo dano direto causado pelo vírus quanto pela resposta imune excessiva do hospedeiro. Assim, a administração de medicamentos como o metilprednisolona ajudaria a suprimir as indesejáveis reações imunológicas (TU *et al.* , 2020).

Um estudo indicou que o uso de metilprednisolona em dose única (40–500 mg) não teve impacto negativo aparente na remoção da SARS-CoV-2 ou na produção de IgG específica, ao mesmo tempo em que interrompeu efetivamente a cascata inflamatória (LIU *et al.* , 2020).

Outro estudo também concluiu que a metilprednisolona pode diminuir a taxa de mortalidade nas formas mais graves da doença (VERONESE *et al.* , 2020). Esse medicamento está sendo avaliado em 46 ensaios clínicos, alguns deles na fase 3.

Uma meta-análise prospectiva de ensaios clínicos de pacientes críticos com COVID-19 mostrou menor mortalidade por todas as causas em 28 dias após a administração de corticosteroides sistêmicos em comparação com o tratamento usual ou placebo (STERNE *et al.* , 2020).

Outra droga corticoesteroide antiinflamatória, a dexametasona, foi recentemente sugerida para tratar pacientes graves com COVID-19. Pacientes em ventilação mecânica ou suporte de oxigênio que receberam dexametasona exibiram

taxas de mortalidade mais baixas em comparação com aqueles que receberam tratamento padrão sozinho (HORBY *et al.* , 2020).

Atualmente, 37 ensaios clínicos estão em andamento para avaliar o risco versus benefício do uso de glicocorticoides no tratamento de COVID-19.

Vários produtos naturais e suplementos alimentares também estão sendo avaliados para o tratamento de pacientes com COVID-19, pois muitos desses medicamentos têm efeitos imunomoduladores (Tabela 2) (EL SAYED *et al.* , 2020).

A colchicina é um alcalóide derivado do açafrão de outono, que há muitos anos é usado para tratar várias doenças inflamatórias, como a gota. Este medicamento está sendo investigado em 35 ensaios clínicos para o tratamento de COVID-19. Os resultados de um estudo clínico realizado por pesquisadores brasileiros mostraram que a colchicina pode ajudar no combate à inflamação pulmonar com recuperação mais rápida para pacientes com COVID-19 moderado a grave (LOPES *et al.* , 2020).

Uma formulação de nanopartículas para administração por spray, chamada ArtemiC (compreendendo artemisinina, curcumina, Boswellia e vitamina C), foi proposta como um tratamento para COVID-19. Este fármaco possui atividades imunomodulatórias bem estabelecidas, demonstradas *in vitro* e *in vivo*, e publicadas ao longo dos anos, diminuindo a atividade dos níveis de TNF- α e IL-6 o que pode ser relevante para os processos fisiopatológicos envolvidos na forma progressiva de COVID-19. Além disso, o ativo os agentes têm atividades antioxidantes, antiinflamatórias, bem como antiagregantes e antimicrobianas proeminentes (JOVIC *et al.* , 2020; BABAEI *et al.* , 2020).

Nesse contexto, compostos naturais, como a curcumina, têm mostrado efeitos benéficos que os tornam um alvo promissor no tratamento adjuvante de COVID-19, conforme revisado recentemente (MACULLOUGH *et al.* , 2021; RATTIS *et al.* , 2021). Um estudo clínico controlado de fase 2 projetado para avaliar o efeito do ArtemiC em pacientes com diagnóstico de COVID-19 está sendo realizado em hospitais em Israel e na Índia (NCT04382040).

5.1.2.5 Inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (ARBs)

A enzima conversora de angiotensina 2 é uma proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células, como o epitélio do sistema respiratório e é um componente crítico na via contrareguladora do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) crucial para a fisiopatologia da Covid-19 (SOUTH *et al.* , 2020).

Hipertensão e doenças cardiovasculares são fatores de risco para morte na COVID-19. A enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), um componente importante do sistema renina-angiotensina, atua como sítio de ligação da SARS-CoV-2 (proteína spike (S)) e facilita a entrada da célula hospedeira nos pulmões em modelos experimentais (LI *et al.* , 2003).

Os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina (ARBs) mostraram aumentar a expressão da ECA2 em vários órgãos, potencialmente promovendo a invasão de células virais, embora esses achados não sejam consistentes entre os estudos (MASCOLO *et al.* , 2020).

Alternativamente, os IECA e os ARBs podem realmente melhorar os mecanismos de defesa ou hiperinflamação do hospedeiro, reduzindo, em última análise, a lesão do órgão. Finalmente, IECA e BRAs podem ter benefícios diretos de proteção renal, pulmonar e cardíaca no contexto da COVID-19 (MASCOLO *et al.* , 2020).

Portanto, não está claro se IECA e BRAs podem ser benéficos ou prejudiciais em pacientes com COVID-19. Dada a alta prevalência de hipertensão, doença cardiovascular e renal no mundo, a alta prevalência de IECA ou ARBs nessas condições e o equilíbrio clínico em relação à continuação vs. descontinuação de IECA / ARBs no contexto de COVID, um ensaio randomizado é necessário com urgência (VADUGANATHAN *et al.* , 2020).

O objetivo do estudo NCT04338009 com 152 participantes foi avaliar o impacto clínico dos inibidores da ECA e dos bloqueadores do receptor da angiotensina nos desfechos de pacientes hospitalizados com COVID-19.

De acordo com este estudo, em comparação com a descontinuação dos inibidores do sistema renina-angiotensina, a continuação não teve efeito no escore global (COHEN *et al.* , 2021).

Outro estudo com 611 pacientes com COVID-19 mostrou que a exposição a IECA reduziu significativamente o risco de doença grave (OR = 0,37, IC 95%: 0,15-0,87, p = 0,03). A exposição a IECA foi associada a infiltrações mais leves observadas na tomografia computadorizada de base, proteína C reativa e ferritina mais baixas, monócitos mais elevados, hospitalização mais curta e menos necessidade de tratamentos empíricos específicos (favipiravir e meropenem). Os dados sugerem que a exposição aos medicamentos IECA pode ter efeitos favoráveis no contexto da pneumonia COVID-19 (SENKAL *et al.* , 2020).

De acordo com as Diretrizes de Tratamento COVID-19 do NIH, os pacientes com COVID-19 que estão recebendo inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou bloqueadores do receptor de angiotensina (ARBs) para doenças cardiovasculares (ou outras indicações não COVID19) não devem interromper esses medicamentos, a menos que a descontinuação é justificada de outra forma por sua condição clínica. As Diretrizes de Tratamento da COVID-19 não recomendam o uso de inibidores da ECA ou ARBs para o tratamento da COVID-19, exceto em um ensaio clínico. Investigações adicionais sobre o papel dos inibidores de ACE, ARBs e ACE2 humano recombinante no tratamento da COVID-19 estão em andamento. ACE2 solúvel recombinante humano (hrsACE2; APN01) pode bloquear significativamente as infecções iniciais de SARS-CoV-2 por um fator de 1.000-5.000 (MONTELI *et al.* , 2020).

O HrsACE2 entrou em um ensaio clínico de fase 2b controlado por placebo, em um ensaio clínico onde nem o examinado nem o examinador sabem o que está sendo utilizado como variável em um dado momento, denominado duplo-cego , em pacientes com COVID - 19 grave (NCT04335136), atuando como um engodo molecular para bloquear a entrada do vírus e como um regulador do sistema renina-angiotensina (MONTEIL *et al.* , 2021).

Remdesivir recebeu autorização para COVID - 19 e demonstrou melhorar os resultados, no entanto, a dose de remdesivir é limitada pela toxicidade hepática e renal. Monteli e colaboradores (2021) avaliaram a terapia usando remdesivir com ACE2 solúvel recombinante visando duas modalidades diferentes do ciclo de vida do SARS-CoV-2: entrada na célula via seu receptor ACE2 e replicação do RNA viral

intracelular. Este tratamento combinado melhorou significativamente suas janelas terapêuticas contra os modelos *in vitro* de SARS-CoV-2. Os dados demonstraram que a combinação de duas modalidades terapêuticas com diferentes alvos exibe fortes efeitos aditivos em concentrações sub-tóxicas.

Alguns ensaios clínicos estão avaliando a combinação de receptores e fármacos bacterianos ACE2 recombinantes (NCT04382950; NCT04375046).

5.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais (mAbs) revolucionaram o tratamento de várias doenças humanas, incluindo câncer e representam uma nova fronteira para o tratamento de doenças infecciosas. Os mAbs neutralizantes são proteínas recombinantes que podem ser derivadas das células B de pacientes convalescentes ou camundongos humanizados e são considerados uma nova classe de intervenção antiviral já que podem se ligar e 'neutralizar' o vírus em pacientes infectados e superam as limitações intrínsecas à terapia com plasma convalescente por exemplo, o risco de doenças transmitidas pelo sangue (TAYLOR *et al.* , 2021).

Os EUA têm o maior número de estudos sobre o assunto, seguidos da China e do Reino Unido. Os anticorpos monoclonais também são classificados como "Intervenções Medicamentosas" de acordo com ClinicalTrials.gov, e alguns desses anticorpos foram desenvolvidos especialmente para o tratamento de COVID-19, como LY3819253 (LY-CoV555 ou bamlanivimab), LY3832479 (LY-CoV016) e BAT2020. Um estudo de fase 1/2 para avaliar a segurança, farmacocinética, imunogenicidade e eficácia do BAT2020 está sendo realizado em pacientes hospitalizados com COVID-19 (NCT04432766) (HE *et al.* , 2021).

O LY-CoV555 é um potente anticorpo monoclonal IgG1 neutralizante (mAb) dirigido contra a proteína spike do SARS-CoV-2 e foi identificado a partir de uma amostra de sangue retirada de um dos primeiros pacientes dos EUA que se recuperou do COVID-19 (JONES *et al.* , 2021).

O ensaio clínico LY-CoV555 concluiu com sucesso a inscrição e as avaliações de segurança primária em um estudo de fase 1 de pacientes hospitalizados com COVID-19 (NCT04411628), e o acompanhamento de longo prazo está em andamento

como um estudo de fase 2/3 em pessoas recentemente diagnosticadas com COVID-19 em ambiente ambulatorial (NCT04427501) (CHEN *et al.* , 2021).

Recentemente, o estudo de fase 3 do LY-CoV555 para a prevenção de COVID-19 em residentes e funcionários em instituições de cuidados de longo prazo começou (NCT04497987). Este medicamento recebeu autorização de uso emergencial do FDA em 10 de novembro de 2020. Além disso, o LY-CoV555 está sendo testado em combinação com o LY-CoV016, que se liga a um epítopo diferente na região de pico do SARS-CoV-2 (DE VRIES *et al.* , 2020).

O estudo está atualmente inscrevendo uma coorte confirmatória maior de pacientes de alto risco e está testando a capacidade da combinação de anticorpos de reduzir o número de pacientes com carga viral persistentemente alta e de reduzir as hospitalizações relacionadas a COVID (DE VRIES *et al.* , 2020).

O anticorpo monoclonal que mais apresenta uso em ensaios clínicos é o tocilizumab, que é um receptor anti-IL-6 humano recombinante humanizado. A IL-6 assume o papel central no COVID-19 porque atua como um amplificador de tempestade de citocinas, induzindo a produção de mais citocinas pró-inflamatórias e a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, enfraquecendo o músculo papilar e levando à disfunção miocárdica (WHO, 2020; BORAS *et al.* , 2020).

Noventa e dois ensaios clínicos randomizados com tocilizumabe estão em andamento, e alguns deles estão nas fases 3 e 4. Tocilizumabe pode ser útil no tratamento de pacientes com COVID-19 com estado hiperinflamatório, apresentando riscos menores de intubação ou morte, mas a eficácia está em discussão (RODRÍGUEZ-BAÑO *et.*, 2021).

O baricitinibe, um inibidor oral de JAK1 / JAK2, tem se mostrado promissor na redução da inflamação das vias aéreas em macacos Rhesus infectados com SARS-CoV-2, levando à supressão rápida e potente da produção derivada de macrófagos alveolares de citocinas e quimiocinas responsáveis pela inflamação e recrutamento de neutrófilos (WANG *et al.* , 2020). Dezoito ensaios clínicos estão em andamento, incluindo este medicamento em combinação com remdesivir (NCT04401579).

Vários outros anticorpos monoclonais estão sendo avaliados para COVID-19 (Tabela 2). A maioria deles tem como alvo a proteína S, GM-CSF ou GM-CSFR, IL-6 ou IL-6R. Dentre eles, o sarilumabe, um anti-IL6R, está presente em 18 ensaios

clínicos em diferentes estágios; o canacinumab, um inibidor da IL-1beta, está em 6 ensaios clínicos; e o clazakizumab (alvos IL-6) e mavrilimumab (alvos GM-CSFR α) (LANG *et al.* , 2020).

5.3 PLASMA CONVALESCENTE

A terapia com plasma convalescente (CP) é outro procedimento testado para COVID-19. Os pacientes que se recuperaram de COVID-19 devem ter um número elevado de anticorpos policlonais produzidos pelo sistema imunológico para prevenir novos círculos de infecção por SARS-CoV-2 (SAHA *et al.* , 2020; YE *et al.* , 2020).

Os ensaios clínicos forneceram evidências robustas de que a transfusão de plasma convalescente é segura em pacientes hospitalizados com COVID-19, apoiando a noção de que a administração precoce de plasma no curso clínico de COVID-19 tem maior probabilidade de reduzir a mortalidade (SHEN *et al.* , 2020; JOYNER *et al.* , 2020). Uma limitação dessa terapia é a variabilidade na potência encontrada no soro de pacientes recuperados na neutralização do antígeno (MARANO *et al.* , 2016).

Um estudo nos EUA (NCT04343261) demonstrou que a administração precoce de plasma convalescente no grupo de pacientes com doença grave resultou em melhores resultados com diminuição da carga viral (IBRAHIN *et al.* , 2020).

Os EUA apresentam o maior número de estudos abordando essa temática, totalizando 63 ensaios clínicos, e a segunda região com maior número de estudos é a Europa (principalmente Itália e Espanha). A América do Sul possui um número significativo de estudos quando comparada a algumas regiões, como o Norte e o Leste Asiático (Figura 2) (NLM, 2020).

Existem 49 estudos com status concluído. A maioria dos estudos está em situação de recrutamento (um total de 73) ou ainda não está recrutando (um total de 18), e 17 dos estudos foram classificados como observacionais.

Apesar do grande número de estudos, em Dezembro de 2021 a Organização Mundial de Saúde passou a não recomendar o uso de plasma convalescente sob a justificativa de que as evidências apontavam que a terapia não oferecia melhora significativa na sobrevivência e também não diminuía o risco de ventilação mecânica, além de que não há padronização ou razões baseadas em evidências para a seleção

do doador ou controle de qualidade do plasma convalescente o que não justificaria o alto custo da sua utilização (WHO, 2022).

5.4 TERAPIA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

Foram encontrados 117 ensaios clínicos avaliando células-tronco mesenquimais (CTM) para o tratamento de pacientes com COVID-19 (Figura 2). As CTMs são células multipotentes não especializadas que têm autorrenovação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos de células.

As CTMs podem ser isoladas do sangue periférico, medula óssea, cordão umbilical ou placenta e, após expansão, podem ser administradas a pacientes com tempestade de citocinas e sepse devido às suas poderosas capacidades antiinflamatórias e imunomoduladoras (LENG *et al.* , 2020).

As habilidades regenerativas e reparadoras das CTMs foram corroboradas por muitos estudos com resultados positivos e altas taxas de recuperação. Com base nisso, a infusão de CTMs pode ser um mecanismo eficaz no gerenciamento e contenção das complicações graves e falência de múltiplos órgãos associadas ao COVID-19 (ABU-EL-RUB,2021).

Alguns estudos clínicos sugeriram que o transplante de CTMs pode melhorar o desfecho de pacientes com COVID-19, possivelmente regulando a resposta inflamatória e promovendo a recuperação de células e órgãos imunológicos (LENG *et al.* , 2020; ZHANG *et al.* , 2020).

6 DISCUSSÃO

Drożdżal e colaboradores (2021) apontam que desde o início da pandemia de Covid 19, fármacos antivirais, imunomoduladores, antimaláricos e outros foram considerados eficazes contra o SARS-CoV-2. Em contrapartida, inúmeros estudos apontavam a limitação ou ineficácia na utilização dos mesmos. Neste levantamento de ensaios clínicos apontamos os fármacos que apresentavam ou não condições de serem utilizados no tratamento da Covid-19 e expusemos os novos medicamentos e suas respectivas fases clínicas.

Şimşek-Yavuz e Çelikyurt (2021) reforçam que existem dois grupos principais envolvidos em estudos: os que visam proteínas ou RNA do vírus e os que interferem em proteínas ou processos biológicos no hospedeiro. Esses grupos incluem os estudos com plasma convalescente, anticorpos monoclonais e contam com fármacos como hidroxicloroquina como um inibidor da entrada viral e lopinavir entre os inibidores de protease. Nesse trabalho pontuamos que mesmo após ampla utilização o tratamento com plasma convalescente não é mais indicado pela FDA, a hidroxicloroquina não possui estudos significativos para apontar sua eficiência e os anticorpos monoclonais ainda estão envolvidos em diversos estudos.

Os anticorpos monoclonais são proteínas sintéticas produzidas para imitar a resposta imune natural. São muito eficazes e possuem vastas aplicações como em doenças autoimunes, asma, tratamentos oncológicos e neurológicos (TAYLOR *et al.*., 2021). Mas agentes aprovados pela FDA para infecções virais eram limitados ao tratamento do Ebola e Vírus Sincicial Respiratório. Mesmo sendo são mais específicos, por serem projetados para atingir uma única proteína ainda requerem estudos mais aprofundados sobre sua utilização (MOUFFAK *et al.*., 2021).

Rehman e autores (2021) salientam que devido ao processo demorado de desenvolvimento de novos medicamentos, as moléculas até então aprovadas pela FDA com eficácia estabelecida para vírus e várias condições inflamatórias são consideradas mais atraentes na terapia com COVID-19. Mas reforçam também a necessidade de ensaios clínicos bem-sucedidos para que haja evidências adequadas para garantir a segurança e a eficácia desses medicamentos.

Embora alguns resultados sejam bastante promissores Rommasi *et al.*., (2021) reforçam que em razão da semelhança da estrutura e do mecanismo de transcrição

do COVID-19 com vários vírus, alguns dos medicamentos estudados apresentaram resultados positivos contra o SARS-CoV-2. No entanto, a eficácia dos outros está em uma aura de ambiguidade e dúvida o que reforça a necessidade da continuidade dos estudos a nível mundial.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mundo inteiro se uniu na busca de terapias eficazes para o tratamento ou prevenção da COVID-19 e hoje existem grandes expectativas em relação as vacinas desenvolvidas até aqui e as que ainda estão em desenvolvimento.

Dificuldades em termos de produção, armazenamento e transporte de doses maiores podem ser desafios para as indústrias farmacêuticas durante a distribuição das vacinas. Por outro lado, esforços têm sido feitos para criar diferentes vacinas com diferentes abordagens para que possam ser utilizadas por toda a população.

Além disso, a busca por novos medicamentos ou o reposicionamento dos fármacos disponíveis podem ser úteis no tratamento da COVID-19 até que o vírus seja erradicado. Embora haja um grande esforço de pesquisadores de todo o mundo, o maior número de ensaios clínicos na Europa e nos EUA sugere a necessidade de investimentos públicos e privados no desenvolvimento de pesquisas de ponta em nível global.

No entanto, os diferentes tipos de estudos e ensaios clínicos em todo o mundo têm o mesmo objetivo de descobrir métodos eficazes de tratamento e / ou prevenção de COVID-19.

Aqui, resumimos cerca de 1.495 ensaios clínicos que avaliaram novos medicamentos ou o reposicionamento de medicamentos no tratamento de COVID-19. Cada estudo contribuiu a favor ou contra a utilização na doença Covid 19.

Os anticorpos monoclonais têm apresentado bons resultados neutralizando o vírus, alvejando citocinas pró-inflamatórias ou vias de sinalização para evitar a tempestade de citocinas que pode ajudar pacientes que sofrem de manifestações clínicas de COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ABBASPOUR KASGARI, H. *et al* . Evaluation of the efficacy of sofosbuvir plus daclatasvir in combination with ribavirin for hospitalized COVID-19 patients with moderate disease compared with standard care: a single-centre, randomized controlled trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3373-3378, 2020. doi.org/10.1093/jac/dkaa332.
- ABU-EL-RUB, E. *et al* . Mesenchymal stem cells and COVID-19: What they do and what they can do. **World Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 9, p. 1318, 2021.
- AFTAB, S. O. *et al* . Analysis of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a potential therapeutic drug target using a computational approach. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2020. doi.org/10.1186/s12967-020-02439-0.
- AG NOVARTIS PHARMA. Study to assess efficacy and safety of DFV890 in patients with COVID-19 pneumonia and impaired respiratory function. [S.l.:S.n.], 2020.
- AGOSTINI, M. L. *et al* . Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. **MBio**, v. 9, n. 2, p. e00218-e0021, 2018. doi.org/10.1128/mBio.00221-18.
- ANAND, V.; CAHAN, A.; GHOSH, S. Clinical Trials. Gov: A Topical Analyses. **AMIA Summits on Translational Science Proceedings**, v. 2017, p. 37, 2017.
- BABAEI, F.; NASSIRI-ASL, M.; HOSSEINZADEH, H. Curcumin (a constituent of turmeric): New treatment option against COVID-19. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5215-5227, 2020. doi.org/10.1002/fsn3.1858.
- BEYERSTEDT, S.; CASARO, E. B.; RANGEL, E. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 905-919, 2021. doi: 10.1007/s10096-020-04138-6.
- BEIGEL, J. H. *et al* . Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. **N Engl J Med**. Jordan, v. 383, n. 19, p. 1813-1826, 2020. doi.org/10.1056/NEJMoa2007764.
- BORAS, B. *et al* . Discovery of a Novel Inhibitor of Coronavirus 3CL Protease as a Clinical Candidate for the Potential Treatment of COVID-19. **BioRxiv Prepr Serv Biol**. United States, v. 10, n. 2020.09, p. 1-13. doi.org/10.1101/2020.09.12.293498.
- BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. A química medicinal de novas moléculas em fase clínica para o tratamento da tuberculose. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 287-328, 2012.
- CAI, Q. *et al* . Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. **Eng Beijing**, v.10, p. 1192-1198, 2020.

- CALY, L. *et al* . The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral Res.**, v. 7, p. 178-187, 2020.
- CAO, B. *et al* . A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. **N Engl J Med.**, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020. doi.org/10.1056/NEJMoa2001282.
- CHAN, J. F-W. *et al* . Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221-236, 2020.
- CHEN, C. *et al* . Favipiravir versus arbidol for COVID-19: a randomized clinical trial. **MedRxiv**, 2020. doi.org/10.1101/2020.03.17.20037432.
- CHEN, P. *et al* . First-in-Human Study of Bamlanivimab in a Randomized Trial of Hospitalized Patients With COVID-19. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 110, n. 6, p. 1467-1477, 2021.
- CHEN, Z. *et al* . Efficacy of hydroxychloroquine in patients with COVID-19: results of a randomized clinical trial. **Medrxiv**, 2020. doi.org/10.1101/2020.03.22.20040758.
- CHOY, K-T. *et al* . Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. **Antiviral Res.**, v. 178, p. 104786, 2020. doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786.
- CHU, C. M. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. **Thorax**, v. 59, n.3, p.252–6, 2004. doi.org/10.1136/thorax.2003.012658.
- COHEN, J. B. *et al* . Continuation versus discontinuation of renin–angiotensin system inhibitors in patients admitted to hospital with COVID-19: a prospective, randomised, open-label trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 9, n. 3, p. 275-284, 2021. doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30558–0.
- DENG, L. *et al* . Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against Corona Virus Disease 2019: A retrospective cohort study. **J Infect.**, v. 81, n. 1, p. e1-e5, 2020.
- DE VRIES, M. *et al* . Comparative study of a 3CLpro inhibitor and remdesivir against both major SARS-CoV-2 clades in human airway models. **BioRxiv**, 2020. doi.org/10.1101/2020.08.28.272880
- DROŽDŽAL, S. *et al* . An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 59, p. 100794, 2021. doi: 10.1016/j.drug.2021.100794. Epub 2021 Dec 9.
- EASTMAN, R. T. *et al* . Remdesivir: a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. **ACS central Science**, v. 6, n. 5, p. 672-683, 2020. doi.org/.1021/acscentsci.0c00489

EL BAIRI, K. *et al* . Repurposing anticancer drugs for the management of COVID-19. **European Journal of Cancer**, v. 141, p. 40-61, 2020.

ELFIKY, A. A. EA, Ribavirin. Remdesivir, sofosbuvir, galidesivir, and tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study. **Life Sci**, 2020. doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117592.

ESLAMI, G. *et al* . The impact of sofosbuvir/daclatasvir or ribavirin in patients with severe COVID-19. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3366-3372, 2020. doi.org/10.1093/jac/dkaa331.

FAN, S. *et al* . Research progress on repositioning drugs and specific therapeutic drugs for SARS-CoV-2. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 1565-1578, 2020.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, v. 34, p. 7-27, 2020.

FURUTA, Y.; KOMENO, T.; NAKAMURA, T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 93, n. 7, p. 449-463, 2017. doi.org/10.2183/pjab.93.027.

GALLO MARIN, B. *et al* . Predictors of COVID-19 severity: a literature review. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2021. doi: 10.1002/rmv.2146.

GREIN, J. *et al* . Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 24, p. 2327-2336, 2020. doi.org/10.1056/NEJMoa2007016.

HALFORD, B. Pfizer tests COVID-19 antiviral. **C&EN Global Enterprise**, p. 9-9, 2020.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.

HE, Z. *et al* . How the clinical research community responded to the COVID-19 pandemic: An analysis of the COVID-19 clinical studies in ClinicalTrials. gov. **JAMIA open**, v. 4, n. 2, p. ooab032, 2021.

HORBY, P. *et al* . Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19-Preliminary Report. **N Engl J Med.**, 2020. doi.org/10.1056/NEJMoa2021436.

HUNG, I. F-N. *et al* . Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir–ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. **The Lancet**, v. 395, n. 10238, p. 1695-1704, 2020. doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4.

IBRAHIM, D. *et al* . Factors associated with good patient outcomes following

convalescent plasma in COVID-19: a prospective phase II clinical trial. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 9, n. 4, p. 913-926, 2020. doi.org/10.1007/s40121-020-00341-2.

JEAN, S-S.; HSUEH, P-R. Old and re-purposed drugs for the treatment of COVID-19. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 18, n. 9, p. 843-847, 2020.

JONES, B. E. *et al* . The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 593, p. eabf1906, 2021.

JOVIC, T. H. *et al* . Could vitamins help in the fight against COVID-19?. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2550, 2020. doi.org/10.3390/nu12092550.

JOYNER, M. J. *et al* . Safety update: COVID-19 convalescent plasma in 20,000 hospitalized patients. In: **Mayo Clinic Proceedings Elsevier**, p.1888-1897, 2020. doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.06.028.

JULANDER, J. G. *et al* . Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. **Antiviral Research**, v. 137, p. 14-22, 2017.

KADAM, S. 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.

KHALAF, K. *et al* . SARS-CoV-2: pathogenesis, and advancements in diagnostics and treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 570927, 2020. doi.org/10.3389/fimmu.2020.570927.

KATZ, S. J.; RUSSELL, A. S. Re-evaluation of antimalarials in treating rheumatic diseases: re-appreciation and insights into new mechanisms of action. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 23, n. 3, p. 278-281, 2011.

KETKAR, H. *et al* . Lack of efficacy of ivermectin for prevention of a lethal Zika virus infection in a murine system. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 1, p. 38-40, 2019. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.012.

KHURROO, M. S. Chloroquine and hydroxychloroquine in coronavirus disease 2019 (COVID-19). Facts, fiction and the hype: a critical appraisal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106101, 2020. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106101.

KURD, R. *et al* . Compassionate use of opaganib for patients with severe COVID-19. **MedRxiv**, 2020. doi.org/10.1101/2020.06.20.20099010.

LANG, F. M. *et al* . GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 8, p. 507-514, 2020.

LAUXMANN, M. A.; SANTUCCI, N. E.; AUTRÁN-GÓMEZ, A. M. The SARS-CoV-2 coronavirus and the COVID-19 outbreak. **International Braz J Urol**, v. 46, p. 6-18, 2020. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S101.

LENG, Z. *et al* . Transplantation of ACE2-mesenchymal stem cells improves the outcome of patients with COVID-19 pneumonia. **Aging and Disease**, v. 11, n. 2, p. 216, 2020. doi.org/10.14336/AD.2020.0228.

LI, W. *et al* . Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450-454, 2003. doi.org/10.1038/nature02145.

LI, X. *et al* . Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 102-108, 2020. doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.

LIBERTUCCI, J.; YOUNG, V. B. The role of the microbiota in infectious diseases. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 35-45, 2019.

LIRA, B. S. de M. M. *et al* . Nitazoxanida: aspectos gerais, sistemas de liberação e potencial de reposicionamento da molécula. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e42610111766-e42610111766, 2021.

LIU, J. *et al* . Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2020. doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0.

LIU, J. *et al* . Successful use of methylprednisolone for treating severe COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 2, p. 325-327, 2020. doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.021.

LOPES, M. I. *et al* . Beneficial effects of colchicine for moderate to severe COVID-19: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. **RMD Open**, v. 7, n. 1, p. e001455, 2021. doi.org/10.1101/2020.08.06.20169573.

MCCULLOUGH, P. A. *et al* . Pathophysiological basis and rationale for early outpatient treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19) infection. **The American Journal of Medicine**, v. 134, n. 1, p. 16-22, 2021. doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.07.003.

MAHMUD, R. *et al* . Ivermectin in combination with doxycycline for treating COVID-19 symptoms: a randomized trial. **Journal of International Medical Research**, v. 49, n. 5, p. 03000605211013550, 2021. doi: 10.1177/03000605211013550.

MANIVANNAN, E. *et al* . The rise and fall of chloroquine/hydroxychloroquine as compassionate therapy of COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 584940, 2021. doi.org/10.3389/fphar.2021.584940.

MARANO, Giuseppe *et al* . Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool?. **Blood Transfusion**, v. 14, n. 2, p. 152, 2016. doi.org/10.2450/2015.0131-15.

MASCOLO, A. *et al* . The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the heart and lung: focus on COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 667254, 2021. doi.org/10.3389/fphar.2021.667254.

MONTEIL, V. *et al* . Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 905-913. e7, 2020. doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.004.

MONTEIL, V. *et al* . Human soluble ACE2 improves the effect of remdesivir in SARS-CoV-2 infection. **EMBO Molecular Medicine**, v. 13, n. 1, p. e13426, 2021. doi.org/10.15252/emmm.202013426.

MOUFFAK, S. *et al* . Recent advances in management of COVID-19: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112107, 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112107.

NG, Rick. **Drugs: from discovery to approval**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Betesda, 2020. Disponível em: <https://www.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20.03.2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Genebra, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO/2019-nCoV/therapeutics/2022.2 Dashboard**. Genebra, 2022.

ÖZCEYLAN, G.; ALTUNTAŞ, S. B. Relationship between initial symptoms and prognosis of patients with Covid-19. **Atención Primaria**, v. 54, n. 1, p. 102146, 2022. doi:10.1016/j.aprim.2021.102146

PEREIRA, A.; DA CRUZ, K. A. T.; LIMA, P. S. Principais aspectos do novo coronavírus sars-cov-2: uma ampla revisão. **Arquivos do MUDI**, v. 25, n. 1, p. 73-90, 2021.

RAJTER, J. C. *et al* . Use of ivermectin is associated with lower mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019: the ivermectin in COVID nineteen study. **Chest**, v. 159, n. 1, p. 85-92, 2021. doi.org/10.1016/j.chest.2020.10.009.

RAHMAN, M. A. *et al* . Comparison of viral clearance between ivermectin with doxycycline and hydroxychloroquine with azithromycin in COVID-19 patients. **Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons**, p. 5-9, 2020. doi.org/10.3329/jbcps.v38i0.47514

RATTIS, B. A.C; RAMOS, S. G.; CELES, M. Curcumin as a Potential Treatment for COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, p. 1068, 2021. doi.org/10.3389/fphar.2021.675287.

REHMAN, S. U.; YOO, H. H. COVID-19 challenges and its therapeutics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 112015, 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112015.

RIBEIRO, T. B. *et al* . Avaliação da resposta inicial de desenvolvimento de ensaios clínicos para COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, 2021.

ROCCO, P. R.M. *et al* . Early use of nitazoxanide in mild Covid-19 disease: randomised, placebo-controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 58, n. 1, 2021. doi.org/10.1101/2020.10.21.20217208.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. *et al* . Treatment with tocilizumab or corticosteroids for COVID-19 patients with hyperinflammatory state: a multicentre cohort study (SAM-COVID-19). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 244-252, 2021.

ROSSIGNOL, J-F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 3, p. 227-230, 2016. doi.org/10.1016/j.jiph.2016.04.001

RUIZ, S. *et al* . Design of prevent: A phase 2 study of the effect of rbt-9 on progression of COVID-19 infection in high-risk individuals, including those with advanced ckd. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. 305-305, 2020.

SACRAMENTO, C. Q. *et al* . The in vitro antiviral activity of the anti-hepatitis C virus (HCV) drugs daclatasvir and sofosbuvir against SARS-CoV-2. **BioRxiv**, 2020. doi.org/10.1101/2020.06.15.153411.

SADEGHI, A. *et al* . Sofosbuvir and daclatasvir compared with standard of care in the treatment of patients admitted to hospital with moderate or severe coronavirus infection (COVID-19): a randomized controlled trial. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 11, p. 3379-3385, 2020. doi.org/10.1093/jac/dkaa334.

SAHA, R. P. *et al* . Repurposing drugs, ongoing vaccine, and new therapeutic development initiatives against COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1258, 2020. doi.org/10.3389/fphar.2020.01258.

ŞENKAL, N. *et al* . Association between chronic ACE inhibitor exposure and decreased odds of severe disease in patients with COVID-19. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 24, n. 1, p. 21, 2020. doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2020.57431.

SHEN, C. *et al* . Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. **Jama**, v. 323, n. 16, p. 1582-1589, 2020. doi.org/10.1001/jama.2020.4783.

SHEAHAN, T. P. *et al* . Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 396, p. eaal3653, 2017. doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653

YAVUZ, S.; ÇELIKYURT, F. I. K. An update of anti-viral treatment of COVID-19. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 51, n. 7, p. 3372-3390, 2021. doi:10.3906/sag-2106-250.

SINGH, T. U. *et al* . Drug repurposing approach to fight COVID-19. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 6, p. 1479-1508, 2020. doi.org/10.1007/s43440-020-00155-6

SOHEILI, E. *et al* . Larkin: FDA Emergency Use Authorized Treatment Protocol of DeltaRex-G for Severe Covid-19 [IND# 27185]. **European Journal of Respiratory Medicine**, v. 3, n. 2, p. 217-222, 2021.

STERNE, J. A. C. *et al* . Association between administration of systemic corticosteroids and mortality among critically ill patients with COVID-19: a meta-analysis. **Jama**, v. 324, n. 13, p. 1330-1341, 2020. doi.org/10.1001/jama.2020.17023.

TAYLOR, P. C. *et al* . Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 6, p. 382-393, 2021. doi:10.1038/s41577-021-00542-x.

TANG, W. *et al* . Hydroxychloroquine in patients with mainly mild to moderate coronavirus disease 2019: open label, randomised controlled trial. **BMJ**, v. 369, 2020. https://doi.org/10.1136/bmj.m1849.

TE, H. S.; RANDALL, G.; JENSEN, D. M. Mechanism of action of ribavirin in the treatment of chronic hepatitis C. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 3, p. 218, 2007.

TONG, S. *et al* . Ribavirin therapy for severe COVID-19: a retrospective cohort study. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106114, 2020. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106114.

TU, Y-F. *et al* . A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2657, 2020. doi.org/10.3390/ijms21072657.

VADUGANATHAN, M. *et al* . Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. 1653-1659, 2020.

VALE, C. D. P. **Velhas terapêuticas para novas aplicações: o reposicionamento de fármacos como estratégia de desenvolvimento**. 2019. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

VERONESE, N. *et al* . Use of corticosteroids in coronavirus disease 2019 pneumonia: a systematic review of the literature. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 170, 2020. doi.org/10.3389/fmed.2020.00170.

VILLALBA, M. A. **Reposicionamento de fármacos para tratamento de doenças infecciosas bacterianas**. 2015. 31f. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 2015.

ZHANG, Y. *et al* . Intravenous infusion of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a potential treatment for patients with COVID-19 pneumonia. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2020.

doi.org/10.1186/s13287-020-01725-4.

ZHU, Z. *et al* . Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e21-e23, 2020. doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060

ZHU, N. *et al* . China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, v. 382, n. 8, p. 727-733, 2020. doi:10.1056/NEJMoa2001017.

WAGSTAFF, K. M. *et al* . Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 3, p. 851-856, 2012. doi.org/10.1042/BJ20120150.

WANG, M-Y. *et al* . SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 587269, 2020. doi:10.3389/fcimb.2020.587269.

WANG, M-Y. *et al* . Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269-271, 2020. doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0.

WARREN, T. K. *et al* . Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. **Nature**, v. 508, n. 7496, p. 402-405, 2014. doi.org/10.1038/nature13027.

WEN, W. *et al* . Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, flvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 516-523, 2022. doi:10.1080/07853890.2022.2034936.

YAMAMURA, H. *et al* . Effect of favipiravir and an anti-inflammatory strategy for COVID-19. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1-3, 2020. doi.org/10.1186/s13054-020-03137-5.

YAO, X. *et al* . In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 732-739, 2020. doi.org/10.1093/cid/ciaa237.

YE, M. *et al* . Treatment with convalescent plasma for COVID-19 patients in Wuhan, China. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 10, p. 1890-1901, 2020. doi.org/10.1002/jmv.25882.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISES *IN SÍLICO* DE EPÍTOPOS PROVENIENTES DA PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL DO SARS- CoV-2

1 INTRODUÇÃO

Vindo de uma grande família de vírus de RNA de fita simples poliadenilada com sentido positivo, o SARS-CoV-2 é responsável pela doença Covid 19 que pode ser de assintomática a forma grave levando ao agravamento da síndrome respiratória aguda grave, elevando o surto que começou em dezembro de 2019 em Wuhan, China, ao status de pandemia declarado em 11 de março de 2020, pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020 & WU *et al.* , 2020) .

Sete coronavírus são capazes de infectar humanos, sendo três potenciais causadores de doenças graves: MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2; enquanto isso, 229E, NL63, HKU1 e OC43 estão ligados a sintomas não relacionados a complicações (PETERSEN *et al.* , 2020).

Embora hajam inúmeros estudos para obtenção de vacinas e fármacos eficazes na prevenção e tratamento da Covid-19, é importante explorar a estrutura das proteínas do vírus, uma vez que são fundamentais para interagir diretamente com o hospedeiro e podem ser a fonte de imunoestimulantes específicos contra a doença (ABRAHAM PEELE *et al.* , 2020).

Sohail e colaboradores propuseram uma estratégia para a identificação *in silico* de epítomos de células T para SARS-CoV-2. A resposta imunológica ideal contra o novo coronavírus deve incluir uma eficiente resposta antiviral inata e uma resposta adaptativa celular e humoral robusta e específica contra o vírus (SCHIJNS & LAVELLE, 2020).

As proteínas estruturais do vírus: proteína do envelope (E), glicoproteína de membrana (M), fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e glicoproteína de superfície (S) estão intimamente associadas à interação patógeno- hospedeiro durante a infecção, que torna-os alvos importantes a serem reconhecidos pelo sistema imunológico além de serem possíveis alvos de medicamentos antivirais viáveis e todas são necessárias para produzir uma partícula viral completa (ONG *et al.* , 2020).

Entre as proteínas estruturais, a proteína Spike é conhecida como a mais importante para o reconhecimento do hospedeiro devido à sua presença em torno do

vírião, e pode ser o melhor alvo para anticorpos neutralizantes. No entanto, as variantes de SARS-CoV-2 descritas durante a pandemia são baseadas principalmente nas diferenças de aminoácidos nas sequências primárias da proteína S, diminuindo a capacidade de neutralização de anticorpos (BARRETO- VIEIRA *et al.* , 2021).

Já a proteína do envelope, que é a menor das proteínas estruturais nos coronavírus, demonstrou executar múltiplos papéis no ciclo de replicação viral como: montagem e patogênese viral além da liberação do vírião (YOSHIMOTO, 2020). É profusamente expressa no interior da célula infectada, porém apenas uma pequena porção é incorporada ao envelope do vírião, está localizada majoritariamente no tráfego intracelular (SCHOEMAN *et al.* , 2019).

Diferentemente de outros vírus envelopados, os coronavírus brotam compartimento intermediário ER-para-Golgi onde adquirem seu envelope de membrana e a partir daí os vírions fazem seu caminho pela via secretora para então serem liberados da célula infectada (SCHOEMAN *et al.* , 2019).

A fim de obter um epítipo imunogênico específico racionalmente selecionado da proteína estrutural do Envelope do SARS-CoV-2 que supera os possíveis problemas associados às variantes do vírus ou apenas um tipo de resposta imune adaptativa, foi identificado nesse trabalho uma sequência consenso mundial da proteína estrutural E com uma alta possibilidade de induzir respostas de células T e B contra o vírus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 VACINOLOGIA REVERSA

Os primeiros relatos da utilização de vacina são de 1796 quando Edward Jenner realizou a imunização contra varíola em uma criança a partir de material infectado das mãos de uma ordenhadeira que havia contraído a varíola bovina. Um século depois Pasteur estabeleceu as regras básicas da vacinologia e houve então o início da sua utilização racional (SETTE *et al.* , 2010).

O desenvolvimento de vacinas, até duas décadas atrás estava atrelado a métodos convencionais, utilizando abordagens bioquímicas, imunológicas e microbiológicas e as vacinas costumeiramente eram desenvolvidas através do cultivo de agentes infecciosos e isolamento do patógeno de forma integral, porém inativado ou de parte de seus componentes purificados (RAPPUOLI *et al.* , 2016).

Com o advento da biologia molecular e do sequenciamento de genomas o entendimento sobre imunopatologia e a complexidade na interação patógeno-hospedeiro ganharam luz e entendimento, revolucionando a vacinologia clássica no que tange o seu desenvolvimento (VELLOSO *et al.* , 2018).

A descoberta de antígenos através de abordagens computacionais para a predição de epítomos imunogênicos *in silico* ao invés da utilização do crescimento de patógenos, sequenciamento de células B, mapeamento de epítomos conformais e uma série de avanços na bioinformática abrem uma nova porta na vacinologia: a vacinologia reversa (RAPPUOLI *et al.* , 2016).

Para identificar antígenos proteicos a vacinologia reversa faz uso combinado de informações imunológicas e genômicas, com isso a identificação de epítomos reconhecidos por células T CD4 e T CD8 é utilizado como forma reversa identificando novos antígenos (SETTE *et al.* , 2010).

É de fundamental importância levar em conta nos estudos de predição de epítomos o grau de polimorfismo associado as moléculas de HLA já que existem milhares de moléculas alélicas e seria impraticável testar todos os conjuntos de peptídeos, com isso uma abordagem mostrou que um número de alelos determinado (entre 10 e 15) permitiria uma ampla cobertura da população e também que a maioria dos alelos HLA pode ser caracterizado em supertipos permitindo a cobertura de quase 90% da população apenas com alguns motivos peptídicos (TONG *et al.* , 2007).

O principal objetivo da vacinologia reversa é identificar vacinas candidatas promissoras e a primeira utilização bem sucedida se deu na aplicação contra o *Meningococcus* do grupo B (MenB) e o primeiro programa de utilização da técnica é o Vaxign (ONG *et al.* , 2020).

2.2 PROTEÍNA DE ENVELOPE

Sabe-se que a proteína do envelope de SARS-CoV é uma pequena proteína incorporada como parte do envelope, contém 75 aminoácidos e varia de 8,4 a 12 kDa, tem o terminal amino hidrofílico curto com 7 a 12 aminoácidos, domínio transmembranar hidrofóbico (TMD) de 25 aminoácidos que em análise comparativa e filogenética revelou que uma porção substancial do TMD consiste de dois aminoácidos neutros não polares, valina e leucina e terminal carboxila hidrofílico longo (SCHOEMAN *et al.* , 2019; LIAO *et al.* , 2006).

No SARS-CoV-2 a proteína do envelope é a mais enigmática e está intrinsecamente envolvida nos aspectos mais importantes de ciclo de vida do vírus. Seu domínio transmembrana (TMD) é necessário para a liberação de partículas virais e seu envolvimento na montagem viral é evidente (SCHOEMAN *et al.* , 2020).

A proteína do envelope do SARS-CoV-2, com suas múltiplas atividades que contribuem para a replicação viral, já que é abundantemente expressa dentro da célula infectada, mas apenas uma pequena porção é incorporada ao envelope do virion é amplamente considerada um alvo potencial para o tratamento da COVID-19 (TILOCCA *et al.* , 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar um epítipo imunogênico racionalmente selecionado, específico da proteína estrutural do envelope do SARS-CoV-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos do presente capítulo:

- a) identificar uma sequência consenso universal da proteína E do SARS-CoV-2.
- b) modelar a proteína consenso estrutural E do SARS-CoV-2.
- c) identificar epítopos lineares promíscuos da proteína consenso estrutural E do SARS-CoV-2.

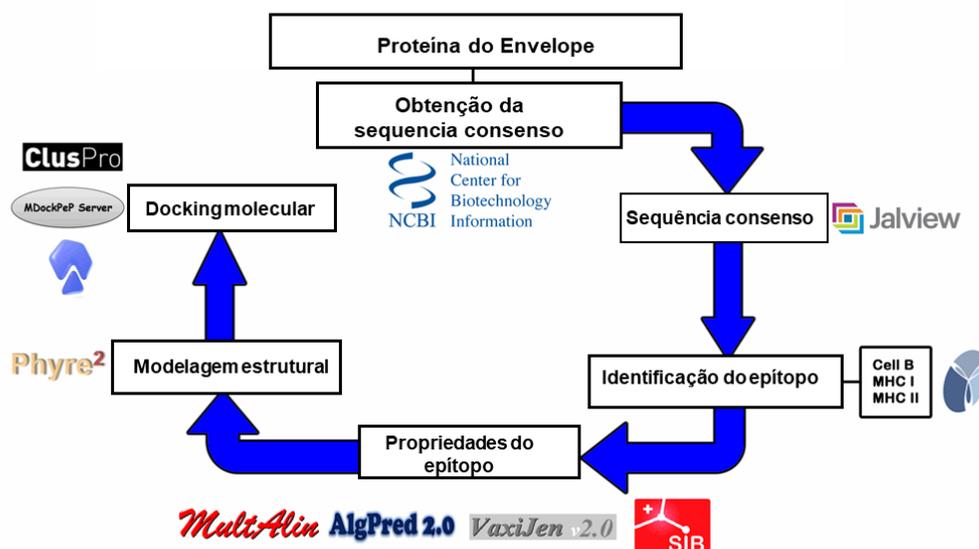
4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSENSO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS PUTATIVAS DE SARS-COV-2

Os métodos seguiram o pipeline apresentado na Figura 1. As sequências de proteínas do SARS-CoV-2 foram obtidos da base de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI). O banco de dados específico para sequências do Sars-CoV-2, encontra-se presente no servidor online, na guia “NCBI Virus”, onde foi utilizada a seguinte identificação: “taxid: 2697049” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>).

Todas as sequências da proteína envelope (E) de todos os continentes presentes no local foram baixados no formato FASTA. O software Jalview (<https://www.jalview.org/>) foi usado para obter a sequência consenso para cada região e a sequência de consenso global para a proteína alvo (WATERHOUSE, 2009).

Figura 1- *Pipeline* da obtenção da sequência consenso da proteína do envelope



Fonte: do autor, 2021.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS

Para as predições de epítomos de célula B, MHC classe I e MHC classe II da proteína alvo, foram utilizados os algoritmos do servidor Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB; <https://www.iedb.org/>), dos quais para cada identificação, fez-se necessária a implementação de uma metodologia, conforme descrita no próximo tópico..

4.3 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE RECEPTOR DE CÉLULAS MHC-I OU MHC-II E B

O servidor BepiPred Linear Epitope Prediction 2.0 (<http://tools.iedb.org/bcell/>) foi usado para obter epítomos de interação de células B, com base em um sistema de algoritmos de aprendizado de máquina chamado Random Forest que classifica as sequências de aminoácidos das proteínas alvo a partir de simulações em proteínas cristalizadas e aminoácidos não considerados epítomos. Um limite de corte padrão de 0,5 foi usado para obter epítomos promíscuos (JESPERSEN *et al.* , 2017).

Para a identificação de epítomos de MHC classe I, utilizou-se a função NetMHCpan EL 4.1 (<http://tools.iedb.org/mhci/>), no qual selecionou-se a opção de obter epítomos que realizam a interação com os 27 alelos de referência de MHC-I (WEISKOPF *et al.* , 2013) que simulam uma maior cobertura da população global, entre 97% e 99%, além de apresentarem características de IC50 e < 500 nM (SETTE *et al.* , 1994), em seguida um limiar de corte de 1% da quantidade total de epítomos encontrados foi definido, vale ressaltar que todas as opções foram recomendadas pela própria plataforma IEDB (MOUTAFTSI *et al.* , 2006, KOTTURI *et al.* , 2007).

Já para a identificação de epítomos de MHC classe II, utilizou-se a função “IEDB recommended 2.22” (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) que consiste no uso de consenso de métodos como NN-align (JENSEN *et al.* , 2018), SMM-align (NIELSEN *et al.* , 2007), CombLib (SIDNEY, *et al.* , 2008) e Sturniolo (STURNIOLO *et al.* , 1999) para obter o melhor resultado possível para uma determinada proteína, no caso deste estudo, da proteína envelope. A combinação dos 27 alelos MHC-II recomendados para a cobertura mundial do população novamente foi utilizada (GREENBAUM *et al.* , 2011), como limiar de corte para todos os epítomos, estabeleceu-se uma classificação

incluindo o limiar de percentil de consenso < 20,0 e epítomos que interajam com mais de 50% dos alelos selecionados (OSEROFF *et al.* , 2010), assim sendo, epítomos que se encaixam nos dois limiares foram selecionados.

4.4 ALINHAMENTO E DETERMINAÇÃO DE EPÍTOPOS DE CONSENSO MUNDIAL

Todos os epítomos encontrados da proteína estrutural do envelope que interagem com os receptores de células B MHC-I e MHC-II foram alinhados usando o servidor MultiAlign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; (CORPET *et al.* , 1988) além disso foi realizado um alinhamento manual para comparação e maior precisão. Do alinhamento, o epítomo com a maior taxa de repetição por região com um tamanho estabelecido de 15 aminoácidos foi selecionada.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS TRANSMEMBRANA

As regiões transmembrana da proteína envelope, foram identificadas a partir do servidor SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisubmit.html>) (MITAKU *et al.* , 2002), de modo, que todos os epítomos presentes nas regiões identificadas, foram excluídos.

4.6 TESTE DE ANTIGENICIDADE, ALERGENICIDADE E PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DE EPÍTOPOS SELECIONADOS

Para o teste de antigenicidade, todos os epítomos foram submetidos ao servidor VaxiJen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), onde um limiar de corte de 0,5 e a tag “antígeno provável” (DOYTCHINOVA, FLOWER, 2007) foram definidos.

Para o teste de alergenidade, o servidor “AlgPred: Prediction of Allergenic Proteins and Mapping of IgE Epitopes” (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>) foi utilizado e o método híbrido foi definido, consistindo na implementação de cinco ferramentas disponíveis no servidor: SVMc, IgE, epitope, ARPs BLAST e MAST (SAHA *et al.* , 2006). Para o teste de propriedades físicoquímicas, utilizou-se a ferramenta ProtParam do servidor Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>), de

modo que um limiar de corte de <40 para os valores de estabilidade da estrutura (GASTEIGER *et al.* , 2003) foi definido.

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE N-GLICOSILAÇÃO

Para a identificação das regiões de N-glicosilação presentes na proteína envelope, utilizou-se o servidor NetNglyc 1.0 Server – prediction results (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), toda a metodologia aplicada, foi a padrão sugerida pelo servidor, no qual se a região em potencial atinge um valor superior a 0,5, tal região englobando 4 aminoácidos, é definida como uma região de N-glicosilação.

4.8 MODELAGEM DA PROTEÍNA ESTRUTURAL E DO SARS-COV-2

Para a modelagem molecular por homologia da proteína do envelope do SARS-CoV-2, o script AlphaFold v2.0 (JUMPER *et al.* , 2021) (<https://github.com/deepmind/alphafold>) foi usado para prever a conformação da cadeia da proteína com alto nível de precisão, em que vários bancos de dados como UniRef90 (UniProt, 2021), Mgnify (MITCHELL *et al.* , 2020), BFD (STEINEGGER *et al.* , 2019), Uniclust30 (MIRDITA *et al.* , 2017), foram utilizados.

4.9 REFINAMENTO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E EPÍTOPOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA E DO SARS-COV-2 PARA DOCKING MOLECULAR

Para o processo de *docking* molecular, se fez necessário a obtenção das proteínas que atuam como receptores, de tal forma as proteínas receptoras foram definidas a partir dos 27 alelos de interação disponibilizados pelo IEDB, e conseqüentemente, uma busca foi realizada no banco de dados do Protein Data Bank (PDB), no intuito de encontrar as estruturas destes alelos, com sua estrutura tridimensional definida. Todas as proteínas, tanto receptor (HLA) quanto ligante (epítipo), foram submetidas a uma preparação, na qual os hidrogênios ausentes das estruturas foram adicionados, as águas presentes no arquivo .pdb foram deletados, a proteína foi escaneada usando o script `complete_pdb().py` do Software MODELLER,

a fim de encontrar átomos ausentes, e a grid box no sítio ativo da estrutura foi definida (WEBB B, 2014).

4.10 HLA E EPÍTOPOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DE ANCORAGEM DO SARS-COV-2

Para a realização dos *dockings*, foi definido o método proteína-peptídeo, que consiste na determinação da proteína receptora como uma estrutura rígida com algumas pequenas conformações das cadeias laterais flexíveis e o ligante peptídeo como uma estrutura flexível. Para isso, foi utilizado os servidores MdockPep (<https://zougrouptoolkit.missouri.edu/mdockpep/index.html>); (XU *et al.* , 2018) e ClusPro2 (<https://cluspro.org/help.php>;) [36]. Além disso, o software Auto Dock Vina foi utilizado com a intenção de obter uma maior gama de resultados e, de tal forma, obter uma maior precisão nos mesmos (TROTT; OLSON, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 SEQUÊNCIA CONSENSO DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO ENVELOPE DO SARS-COV-2 DE DIFERENTES GENOMAS DEPOSITADOS EM UM BANCO DE DADOS.

A partir do banco de dados NCBI, foram analisadas 13.466 putativas proteínas da envelope do SARS-CoV-2 de genomas traduzidos e depositados em bancos de dados públicos dos seis continentes (Tabela 1).

Tabela 1- Número de genomas do SARS-CoV-2 depositados em bancos de dados públicos em cada continente.

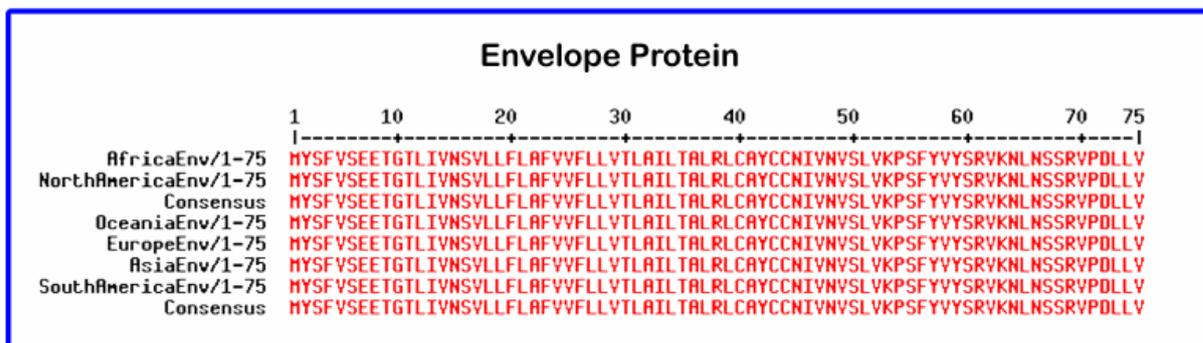
| | África | América do Norte | América do Sul | Ásia | Europa | Oceania | Total |
|---------|--------|------------------|----------------|-------|--------|---------|---------------|
| Genomas | 106 | 10.326 | 31 | 1.175 | 409 | 1.419 | 13.466 |

Fonte: da autora, 2021.

A América do Norte é o continente com o maior número de sequências obtidas da proteína envelope do SARS-CoV-2 com um total de 10.326 sequências, seguido da Oceania (1.419 sequências), da Ásia (1.175 sequências), da Europa (409 sequências), da África (106 sequências) e, finalmente, América do Sul (31 sequências).

Após a obtenção de todas as sequências, realizou-se um processo de obtenção de uma sequência consenso a partir de todas as proteínas obtidas da envelope, visto que cada depósito realizado no banco de dados NCBI apresentava mutações e/ou variações em suas sequências, desta forma realizou-se um alinhamento global a partir do caráter de conservação, definiu-se a proteína que representa uma sequência global, que em seguida, seria utilizada na obtenção de supostos epítomos (Figura 2).

Figura 2- Alinhamento da sequência primária dos aminoácidos que caracterizam a proteína do envelope do SARS-CoV-2 em cada continente a partir dos resultados da sequência consenso por continente.



Fonte: do autor, 2021.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS DA SEQUÊNCIA CONSENSO DA PROTEÍNA E DE SARS-COV-2 QUE INTERAGEM COM AS MOLÉCULAS DE MHC E BCR.

De acordo com a Tabela 2, o maior número de epítomos da proteína estrutural do envelope de SARS-CoV-2 interage mais com MHC-I e menos com receptores de células B. A proteína E, com 75 aminoácidos, apresentou 68 epítomos putativos nesta sequência.

Tabela 2- Epítomos da proteína estrutural E de SARS-CoV-2

| | Envelope |
|----------------------|----------|
| Receptor de célula B | 2 |
| MHC-I | 36 |
| MHC-II | 30 |

Fonte: da autora, 2021.

5.3 SELEÇÃO RACIONAL DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PUTATIVOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO SARS-COV-2 INDICA PELO MENOS UM EPÍTOPO CANDIDATO NA PROTEÍNA DO ENVELOPE

Para obter-se os melhores candidatos de epítomos imunogênicos putativos da proteína do envelope, os 68 epítomos foram alinhados e as sequências de aminoácidos lineares com tamanho fixado de 15 aminoácidos que apresentaram maior taxa de repetição foram selecionados. Além disso, os epítomos apresentados nos locais de ancoragem transmembrana foram excluídos por apresentarem características hidrofóbicas que causam difíceis interações com os aminoácidos presentes nas ranhuras do MHC-I ou MHC-II. Após essa seleção, 34 epítomos foram obtidos e em seguida testados de maneira *in silico*, em um teste de antigenicidade usando o servidor VaxiJen 2.0, no qual, excluiu-se 18 epítomos, restando então 16 epítomos, logo a seguir, estas 16 sequências foram analisadas quanto as suas características de alergenicidade, visto que idealmente o epítomo não poderia provocar uma reação alérgica ao corpo humano, assim o servidor AlgPred foi utilizado, sendo 7 epítomos excluídos nesta etapa.

Por fim, realizou-se o teste de propriedade físico-químicas, com o intuito de verificar se a estrutura do epítomo, seria estável, visto que um epítomo instável não poderia ser sintetizado para testes *in vivo* e *in vitro*, entretanto, todos os epítomos para a proteína envelope, foram excluídos nesta etapa, visto que nenhum epítomo com tamanho fixado de 15 aminoácidos apresentava características ideais de estabilidade, de tal forma, se fez necessário a ampliação dos epítomos para tamanho 16, e novamente com um resultado negativo ampliou-se para um tamanho 17, onde este apresentou um epítomo com características de estabilidade ideais.

Os testes de antigenicidade e alergenicidade, foram refeitos para o epítomo com tamanho maior e os resultados estão descritos na tabela 3.

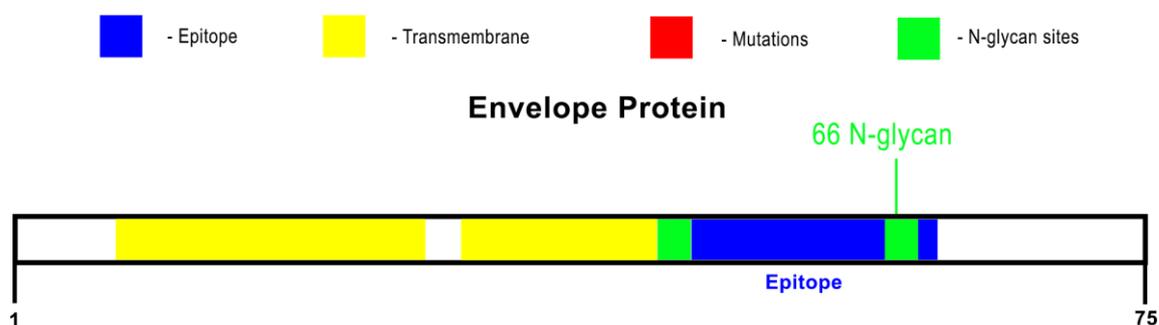
Tabela 3- Antigenicidade, alergenicidade e propriedades físico-químicas do epítipo selecionados para a proteína estrutural consenso do envelope.

| | Envelope |
|-------------------------|-------------------|
| Sequência | LVKPSFYVYSRVKLNLS |
| Antigenicidade | 0,6582 |
| PM (peso molecular) | 2014,36 |
| PI (ponto isoelétrico) | 10,00 |
| Estabilidade | 38,99 |
| Meia Vida Reticulócitos | 5,5 h |
| Meia vida levedura | 3 min |
| Meia vida E. Coli | 2 min |
| Epítipo IgE | Não |
| Alergenicidade | Não |

Fonte: da autora, 2021.

Vale ressaltar que duas regiões de N-glicosilação foram encontradas na proteína, uma presente na região NVSL (referente aos aminoácidos 48-52) com valor de predição de 0.6507 e outra NSSR (referente aos aminoácidos 66-70) com valor de predição de 0.6339, sendo esta última presente na região final do epítipo como destacado na figura 3.

Figura 3- Epítipos, sítios transmembranares e n-glicanos da proteína estrutural E do SARS-CoV-2



Fonte: da autora, 2021.

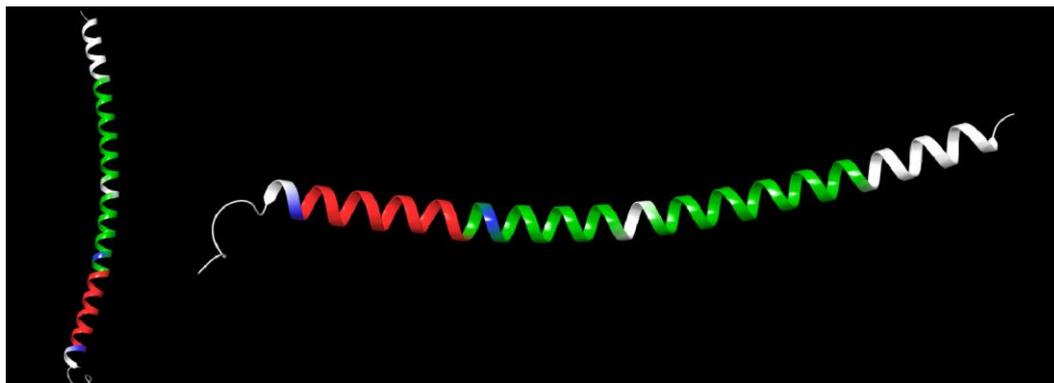
Legenda: identificação de epítipos putativos (azul), locais transmembrana (amarelo) e n-glicano (verde), sem mutações na proteína

5.4 IDENTIFICAÇÃO DA POSIÇÃO DO EPÍTIPO IMUNOGÊNICO PUTATIVO SELECIONADO DA PROTEÍNA ESTRUTURAL DO ENVELOPE DO SARS-COV-2 APÓS MODELAGEM MOLECULAR POR HOMOLOGIA

Para identificar a posição de epítipos imunogênicos putativos selecionados na proteína envelope do SARS-CoV-2, foi realizado o processo de modelagem molecular

por homologia, visto que não havia nenhuma proteína de envelope depositada no banco de dados Protein Data Bank, com suas coordenadas tridimensionais. Assim o script AlphaFold foi utilizado para a realização da modelagem onde o mesmo determinou a estrutura representada na figura 4.

Figura 4- Representação em diagrama 3D da modelagem molecular por homologia da estrutura da proteína do envelope do vírus SARS-CoV-2



Fonte: do autor, 2021.

Legenda: Em verde as regiões transmembrana da proteína, em vermelho o epítipo e em azul escuro as regiões de n-glicosilação da proteína. As duas imagens representam a mesma proteína, alterando apenas forma de visualização.

5.5 DOCKING MOLECULAR ENTRE OS EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS PUTATIVOS SELECIONADOS DA PROTEÍNA ESTRUTURAL E DO SARS-COV-2, MHC-I E MHC-II MOSTRAM ALTAS PROBABILIDADES DE INTERAÇÃO ENTRE ELES

Embora nem todas as estruturas de MHC-I e MHC-II tenham sido encontradas no banco de dados (IEDB), foi utilizada a estrutura de cinco proteínas de alelos MHC-I e três alelos MHC-II de acordo com o apresentado na Tabela 4.

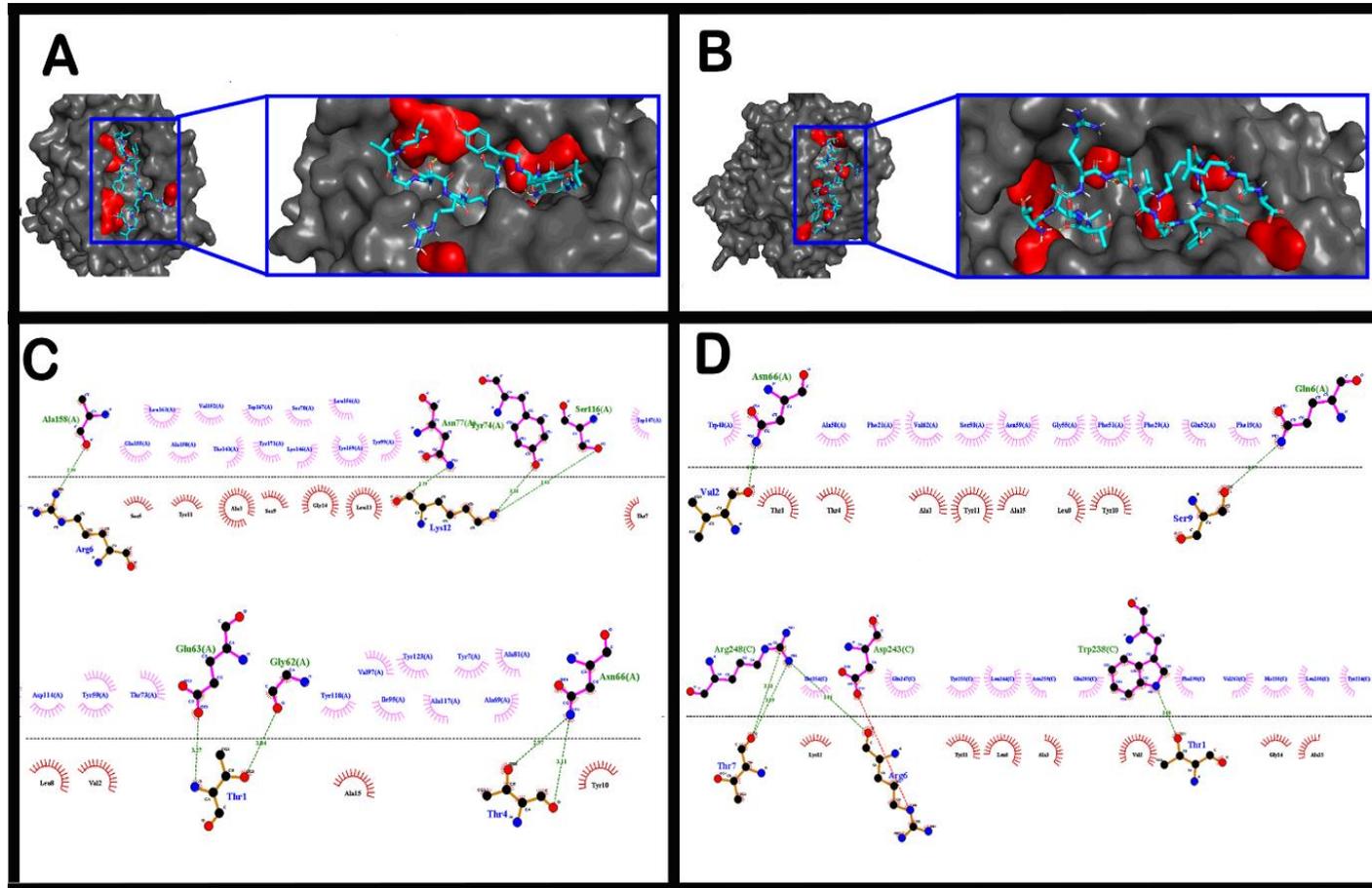
Tabela 4- *Docking* molecular entre epítomos selecionados do consenso da proteína estrutural e HLAs do SARS-CoV-2

| Envelope | Alelo | ClusPro Center/ Lowest Energy | MdockPep | AutoDock Vina |
|----------|----------------|-------------------------------------|----------|------------------|
| MHC-I | HLA-A*0203 | -842,2 / -842,2 | -266,03 | -7,1 |
| | HLA-B*0801 | -636,7 / -96,7 | -239,0 | -7,3 |
| | HLA-B*1501 | -635,5 / -791,4 | -261,9 | -7,4 |
| | HLA-B*3501 | -679,4 / -923,0 | -273,9 | -6,4 |
| | HLA-A*0206 | -749,8 / -749,8 | -270,2 | -5,7 |
| MHC-II | HLA DRB1*0401 | -695,2 / 806,9 | -275,3 | -7,2 |
| | HLA-DRB1*15:01 | -847,4 / -913,3 | -273,2 | -6,9 |
| | HLA-DRB1*01:01 | -788,7 / -917,0 | -276,5 | -5,8 |

Fonte: da autora, 2021.

Os resultados demonstraram grande energia de interação com base em dois diferentes servidores online e pelo software Autodock Vina. Para representar o encaixe molecular entre o epítipo e os alelos MHC-I e MHC-II, escolhemos a interação com o maior poder de interação indicada pelos servidores e pelo software. A melhor interação entre a proteína do envelope (E) e MHC-I estava com o alelo HLA-B * 1501 (Figuras 5A e 5C) e MHC-II com o Alelo HLA-DRB1 * 04: 01 (Figuras 5B e 5D).

Figura 5- Docking molecular



Fonte: da autora, 2021.

Legenda: Os pontos de contato são demonstrados nas Figuras 5A e 5B em vermelho, de modo que suas interações estão representadas no diagrama 5D acima, da mesma forma, nas figuras 5C e 5D, a divisão central é necessária para a identificação dos aminoácidos, sendo os aminoácidos do lado de cima da linha central referentes ao alelo e os de baixo, referente ao epítipo. Fonte: do autor

Como pode-se observar no diagrama 3D apresentados na figura anterior, o epítipo realizou inúmeros contatos com os seus respectivos contatos com MHCs, sendo representados tabela 5:

Tabela 5- Interações entre epítipo e alelos

| Figura | Alelo | Pontes de hidrogênio | Pontes de sal | Interações hidrofóbicas envolvendo epítipo | Interações hidrofóbicas envolvendo alelo |
|--------|-------------------|----------------------|---------------|--|--|
| 2C | HLA-B*1501 | 8 | 0 | 11 | 24 |
| 2D | HLA-DRB *04:01 | 6 | 1 | 14 | 22 |

Fonte: da autora, 2021.

Vale ressaltar que o mesmo aminoácido pode realizar mais de uma interação hidrofóbica, explicando-se assim o fato do epítipo ter tamanho 15, e apresentar valor superior de interações hidrofóbicas.

6 DISCUSSÃO

A urgência de uma vacina eficaz contra patógenos emergentes e de rápida transmissão, como o novo coronavírus, é uma realidade. A OMS informou, após um ano e meio de situação de pandemia de COVID-19, que existiam mais de 284 vacinas em desenvolvimento, 100 em estudos clínicos em diferentes fases, nove em fase III já publicadas, duas de Tecnologia de RNA mensageiro (Pfizer, Moderna), quatro de vetores virais (AstraZeneca, Gamaleya, Jansen, CanSino), uma de proteína recombinante (Novavax) e duas de vírus inativado (Sinopharm) (FUNK *et al.* , 2021).

Aqui usamos abordagens *in silico* para obter epítomos da proteína do envelope do SARS-CoV-2 para atingir, em um curto período de tempo, um peptídeo imunogênico específico capaz de ser usado como uma vacina baseada em peptídeo segura. Atualmente, inúmeros projetos para o desenvolvimento de vacinas eficazes têm sido realizados, e algumas dessas vacinas já estão disponíveis comercialmente para humanos (HISHAM *et al.* , 2021).

No entanto, as técnicas tradicionais de produção de vacinas apresentam algumas desvantagens, que podem ser superadas com o uso de abordagens computacionais (SINGH *et al.* , 2020). Além disso, avanços recentes na bioinformática forneceram uma variedade de ferramentas e servidores capazes de reduzir o custo e o tempo de avanço da vacina tradicional. As abordagens de imunoinformática podem ser usadas para analisar antígenos de patógenos, prever seus epítomos e avaliar sua imunogenicidade (UL QAMAR *et al.* , 2020).

Além disso, vacinologia reversa, predição de epítomo, vacinologia estrutural, abordagens racionais e *docking* molecular são de grande utilidade na concepção de uma vacina potencial contra COVID-19 (SINGH *et al.* , 2020).

Neste trabalho, algumas dessas técnicas de bioinformática foram utilizadas para se chegar a um consenso de sequência de aminoácidos da proteína estrutural do envelope do SARS-CoV-2 usando as sequências de genomas depositadas no banco de dados de diferentes regiões do mundo após a obtenção de uma sequência consenso global.

A estratégia de obter uma sequência de consenso da proteína pode diminuir a possibilidade de observação de variantes, mas aumenta a possibilidade de definir as sequências de aminoácidos conservadas dessas proteínas em genomas

disponíveis ao redor do mundo. Aqui, fomos capazes de definir a estrutura tridimensional da proteína consenso e identificar suas estruturas secundárias usando modelagem molecular e dados de inteligência artificial. Além disso, as abordagens de imunoinformática podem direcionar de forma racional a identificação de epítomos imunogênicos putativos para projetar uma vacina baseada em epítomos para controlar o SARS-CoV-2 (NAVEED *et al.* , 2021).

Também demonstramos que o uso sequencial de técnicas racionais *in silico* tornou possível selecionar o melhor epítomo capaz de interagir com o receptor de células B, que pode estimular uma resposta humoral adaptativa específica, ou alelos MHC-I e MHC-II, que podem estimular uma resposta imune adaptativa celular com base na ativação de TCD8 + ou TCD4 +, respectivamente (WALLS *et al.* , 2020).

Com base no conhecimento de como ocorre a infecção, quais resíduos são responsáveis e quais átomos estão envolvidos, podemos inferir o impacto dessas mutações na atividade da proteína. Os vírus sofrem mutações constantes, mas apenas algumas mutações importantes podem afetar de alguma forma, tornando uma variante mais virulenta, com maior poder de disseminação ou mais letal, e isso depende muito de onde essa mutação ocorre (NELSON *et al.* , 2021).

Usando as abordagens indicadas neste trabalho, vacinas baseadas em peptídeos facilitam o manuseio de variantes. A única forma de realizar o manejo de uma vacina com a seqüência protéica completa é alterando a própria seqüência como um todo.

Por outro lado, as vacinas peptídicas, que são as pequenas regiões da proteína que apresentam características que estimulam uma resposta imune, podem ser administradas de duas formas: utilizando um *pool* de peptídeos que escapam e não estão dentro das áreas mais frequentes que apresentam mutação e substituição da proteína ou no advento do surgimento de uma nova variante onde essa substituição é justamente no peptídeo utilizado e pode realizar apenas aquela substituição (CHAUHAN *et al.* , 2021).

Além disso, a geração de vários locais-alvo como outras proteínas estruturais de um patógeno específico pode aumentar as possibilidades do sistema imunológico do hospedeiro reconhecer e eliminar o invasor.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho identificam o epítopo mais provável de ser imunogênico na proteína do envelope (E).

É importante observar que variantes nessas proteínas não são descritas como mais transmissíveis, letais ou resistentes a vacinas. O epítopo foi avaliado quanto ao seu potencial para interagir com moléculas do sistema imunológico e a segurança para ser usado em humanos, uma vez que não é alergênico, mas antigênico com uma boa meia-vida em mamíferos, leveduras ou *E. coli*.

Por fim, os resultados obtidos baseiam-se em custo e tempo relativamente reduzidos em relação às técnicas tradicionais, mas é necessário avaliar a ação do peptídeo selecionado associado a adjuvantes para defini-lo funcionalmente como imunogênico e possível candidato a ser utilizado como vacina baseada em peptídeos.

A vacinação é o método mais eficaz e seguro de criar uma barreira imunológica, capaz de interromper a transmissão da SARS-CoV-2 e prevenir a patologia mais grave da doença. Quando a campanha de vacinação efetiva é combinada com outros métodos preventivos de distanciamento social e uso de máscara de proteção individual, ao longo do tempo ocorre uma redução significativa no número de casos da doença, ainda que o convívio social de sua população volte.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM PEELE, K. *et al* . Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: A in-silico study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-9, 2020. doi: 10.1080/07391102.2020.1770127.
- BARRETO-VIEIRA, D. F. *et al* . Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, 2021. doi: 10.1590/0074-02760200443.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Geórgia, 2021.
- CHAUHAN, N. *et al* . Interpretative immune targets and contemporary position for vaccine development against SARS-CoV-2: A systematic review. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 4, p. 1967-1982, 2021. doi:10.1002/jmv.26709.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988. doi: 10.1093/nar/16.22.10881.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-4.
- FUNK, C. D.; LAFERRIÈRE, C.; ARDAKANI, A. Target product profile analysis of COVID-19 vaccines in phase III clinical trials and beyond: an early 2021 perspective. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 418, 2021.
- GASTEIGER, E. *et al* . ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003. doi:10.1093/nar/gkg563.
- GREENBAUM, J. *et al* . Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**, v. 63, n. 6, p. 325-335, 2011. doi:10.1007/s00251-011-0513-0.
- HISHAM, Y. *et al* . Identification of Highly Conserved SARS-CoV-2 Antigenic Epitopes with Wide Coverage Using Reverse Vaccinology Approach. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 787, 2021. doi:10.3390/v13050787.
- JENSEN, K. K. *et al* . Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 394-406, 2018. doi:10.1111/imm.12889.
- JESPERSEN, M. C. *et al* . BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. W1, p. W24-W29, 2017. doi:10.1093/nar/gkx346.

JUMPER, J. *et al* . Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v.596, p.583–589, 2021. doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2.

KELLEY, L. A. *et al* . The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015. doi:10.1038/nprot.2015.053

KOTTURI, M. F. *et al* . The CD8+ T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus involves the L antigen: uncovering new tricks for an old virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 10, p. 4928-4940, 2007. doi:10.1128/JVI.02632-06.

LIAO, Y. *et al* . Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 264-275, 2006. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.028.

LEHMANN, A. A. *et al* . Deconvoluting the T Cell Response to SARS-CoV-2: Specificity Versus Chance and Cognate Cross-Reactivity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.635942.

ONG, E. *et al* . COVID-19 coronavirus vaccine design using reverse vaccinology and machine learning. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1581, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.01581.

OSEROFF, C. *et al* . Molecular determinants of T cell epitope recognition to the common Timothy grass allergen. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 943-955, 2010. doi:10.4049/jimmunol.1000405

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic. March 12, 2020. Genebra, 2020.

PETERSEN, E. *et al* . Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30484-9.

MITAKU, S.; HIROKAWA, T.; TSUJI, T. Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane–water interfaces. **Bioinformatics**, v. 18, n. 4, p. 608-616, 2002. doi:10.1093/bioinformatics/18.4.608.

MIRDITA, M. *et al* . Uniclust databases of clustered and deeply annotated protein sequences and alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D170-D176, 2017.

MITCHELL, A. L. *et al* . MGnify: the microbiome analysis resource in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D570-D578, 2020.

MOUTAFTSI, M. *et al* . A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine TCD8+-cell responses to vaccinia virus. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 817-819, 2006. doi: 10.1038/nbt1215.

- NAVEED, M. *et al* . Design of a novel multiple epitope-based vaccine: An immunoinformatics approach to combat SARS-CoV-2 strains. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 7, p. 938-946, 2021. doi:10.1016/j.jiph.2021.04.010.
- NELSON, G. *et al* . Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y. V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. **BioRxiv**, 2021.
- NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-238.
- RAPPUOLI, R. *et al* . Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 4, p. 469-481, 2016.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. suppl_2, p. W202-W209, 2006. doi:10.1093/nar/gkl343
- SANTOS, K. S. *et al* . Immunodominant B cell epitope in SARS-CoV-2 RBD comprises a B. 1.351 and P. 1 mutation hotspot: implications for viral spread and antibody escape. **MedRxiv (The Preprint Server For Health Sciences)**, p. 18, 2021.
- SCHIJNS, V.; LAVELLE, E. C. Prevention and treatment of COVID-19 disease by controlled modulation of innate immunity. **European Journal of Immunology**, v. 50, n. 7, p. 932-938, 2020. doi:10.1002/eji.202048693.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1-22, 2019. doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Is there a link between the pathogenic human coronavirus envelope protein and immunopathology? A review of the literature. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2086, 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.02086.
- SETTE, A. *et al* . The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. **The Journal of Immunology**, v. 153, n. 12, p. 5586-5592, 1994.
- SETTE, A.; RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530-541, 2010. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.017.
- SINGH, N. *et al* . Molecular characterization, pathogen-host interaction pathway and in silico approaches for vaccine design against COVID-19. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 110, p. 101874, 2020. doi:10.1016/j.jchemneu.2020.101874.

SMITH, C. C. *et al.* . Landscape and selection of vaccine epitopes in SARS-CoV-2. **Genome Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-23, 2021. doi:10.1186/s13073-021-00910-1.

SOHAIL, M. S. *et al.* . In silico T cell epitope identification for SARS-CoV-2: Progress and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 171, p. 29-47, 2021. doi:10.1016/j.addr.2021.01.007.

STEINEGGER, M.; MIRDITA, M.; SÖDING, J. Protein-level assembly increases protein sequence recovery from metagenomic samples manifold. **Nature Methods**, v. 16, n. 7, p. 603-606, 2019. doi.org/10.1038/s41592-019-0437-4.

STURNIOLO, T. *et al.* . Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 555-561, 1999. doi:10.1038/9858.

TILOCCA, B. *et al.* . Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 4-5, p. 182-187, 2020.

TONG, J. C.; TAN, T. W.; RANGANATHAN, S. In silico grouping of peptide/HLA class I complexes using structural interaction characteristics. **Bioinformatics**, v. 23, n. 2, p. 177-183, 2007. doi:10.1093/bioinformatics/btl563.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. doi: 10.1002/jcc.21334

UL QAMAR, M. T. *et al.* . Reverse vaccinology assisted designing of multiepitope-based subunit vaccine against SARS-CoV-2. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2020. doi: 10.1186/s40249-020-00752-w.

UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D480-D489, 2021.

VELLOSO, J. P. L. *et al.* . **Análise de aspectos estruturais em imunoinformática utilizando candidatos vacinais contra Leishmaniose que foram selecionados usando vacinologia reversa**. 2018. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)- Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2018.

WALENSKY, R. P.; WALKE, H. T.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 variants of concern in the United States—challenges and opportunities. **Jama**, v. 325, n. 11, p. 1037-1038, 2021.

WALLS, A. C. *et al.* . Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* . Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033

WEBB, B.; SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. **Methods MolBiol.**, v.1137, p.1-15, 2014. doi:10.1007/978-1-4939-0366-5_1.

WEISKOPF, D. *et al* . Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 22, p. E2046-E2053, 2013. doi: 10.1073/pnas.1305227110.

WU, D. *et al* . The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44-48, 2020. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.004.

XU, X.; YAN, C.; ZOU, X. MDockPeP: An ab-initio protein–peptide docking server. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 28, p. 2409-2413, 2018. doi:10.1002/jcc.25555.

YOSHIMOTO, F. K. The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19. **The Protein Journal**, v. 39, n. 3, p. 198-216, 2020. doi: 10.1007/s10930-020-09901-4.