

## Artigo

**COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica**

de Almeida, J. O.; de Oliveira, V. R. T.; Avelar, J. L. S.; Moita, B. S.; Lima, L. M.\*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (6), 0000-0000. Data de publicação na Web: 17 de Setembro de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>**COVID-19: Physiopathology and Targets for Therapeutic Intervention**

**Abstract:** The pandemic status of COVID-19 was recorded by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020. Since then, more than 10 million cases have been confirmed worldwide, with more than 500,000 reported deaths. Throughout this period, efforts by the global scientific community have focused on understanding the disease process and searching on preventive (e.g. vaccines) or therapeutic (e.g. drugs) alternatives of treatment for COVID-19. The present review portrays the historical aspects associated with the discovery of SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, describes the pathophysiological aspects of the disease, the viral replication process and discusses the main molecular targets subject to therapeutic intervention, aiming the design, discovery and development of new drugs to treat COVID-19.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV-2; molecular targets; spike protein; proteases.

**Resumo**

O status pandêmico da COVID-19 foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. Desde então mais de 20 milhões de casos foram confirmados no mundo, com mais de 900 mil mortes reportadas. Ao longo deste período a comunidade científica mundial tem debruçado esforços em entender o desenvolvimento da doença e buscar alternativas de tratamento preventivo (p. ex., vacinas) ou terapêutico (p. ex., fármacos) para a COVID-19. A presente revisão retrata os aspectos históricos associados a descoberta do SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, pontua o processo fisiopatológico da doença, as etapas de replicação viral e discute os alvos moleculares passíveis de intervenção terapêutica, visando o desenho, descoberta e desenvolvimento de fármacos para o tratamento da COVID-19.

**Palavras-chave:** COVID-19; SARS-CoV-2; alvos moleculares; proteína spike, proteases.

\* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, Av. Pedro Calmon, 550, CP: 68024, CEP: 21941-902, Cidade Universitária, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

 [lidialima@ufrj.br](mailto:lidialima@ufrj.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20200000](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200000)

## COVID-19: Fisiopatologia e Alvos para Intervenção Terapêutica

Juliana O. de Almeida, Victoria Regina T. de Oliveira, João Lucas dos S. Avelar,  
Bruna Simões Moita, Lídia Moreira Lima\* 

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>, <http://www.farmacia.ufrj.br/lassbio/>), CCS, Cidade Universitária, CP: 68024, CEP: 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

\*[lidialima@ufrj.br](mailto:lidialima@ufrj.br)

*Recebido em 13 de Julho de 2020. Aceito para publicação em 31 de Agosto de 2020.*

### 1. Introdução

### 2. Processo de Infecção Viral

- 2.1. Adesão, penetração e desnudamento viral
- 2.2. Síntese de poliproteínas virais
- 2.3. Replicação genômica e montagem de novos vírions
- 2.4. Exocitose de novos vírions

### 3. Fisiopatologia da Doença

- 3.1. Aspectos respiratórios
- 3.2. Aspectos cardiovasculares
- 3.3. Aspectos neurais
- 3.4. Aspectos renais

### 4. Potenciais Alvos Terapêuticos

- 4.1. Serina-serina protease transmembranar (TMPRSS-2)
- 4.2. Furina
- 4.3. Protease viral (3CLpro)
- 4.4. Protease viral do tipo papaína (P1pro)
- 4.5. RNA-polimerase dependente-RNA (RpRd)
- 4.6. Moduladores do processo de endocitose
- 4.7. Receptor de Interleucina-6 (IL-6R)
- 4.8. Glicoproteína S (Spike)

### 5. Considerações Finais

## 1. Introdução

A atual pandemia de COVID-19 (do inglês – *Coronavirus Disease-19*) teve seus primeiros casos relatados em dezembro de 2019, em

Wuhan, província de Hubei, na China.<sup>1</sup> Trata-se de uma doença respiratória decorrente da infecção causada pelo novo coronavírus, posteriormente batizado de SARS-CoV-2.<sup>2</sup> Os coronavírus (CoV) são RNA vírus pertencentes à família *Coronaviridae*, formados por RNA de fita simples positiva,

contendo um nucleocapsídeo e proteínas *spike* ou espículas – que conferem aparência de coroa solar (*Corona* em latim). Desde meados dos anos 1960, a capacidade de CoV promover infecções respiratórias em seres humanos e em animais é conhecida, constituindo a segunda principal causa de resfriado comum, perdendo apenas para infecções por rinovírus. Até final do século XX, raramente estiveram associados a doenças mais graves. Os CoV são vírus da ordem *Nidovirales*, classificados em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta. Os coronavírus do gênero beta são responsáveis pela maior gravidade e letalidade das infecções promovida por CoV nas últimas duas décadas.<sup>3,4</sup>No início dos anos 2000 surgiram, na China, os primeiros relatos relacionando os CoV com síndromes respiratórias graves em humanos, a exemplo da Síndrome Respiratória Aguda Grave, que ficou conhecida pela sigla SARS (do inglês: *Severe Acute Respiratory Syndrome*). Entre 2002 e 2003 foram reportados mais de 8 mil casos da doença e 774 mortes concentradas na Ásia oriental e ocidental, assim como relatos de óbitos na África do Sul, América Central e Europa.<sup>4</sup>

Dez anos depois, em abril de 2012, uma nova epidemia de SARS foi reportada, inicialmente na Arábia Saudita e posteriormente em outros países do Oriente Médio, na Europa e na África, como consequência da infecção por outro CoV - distinto do causador da SARS-CoV em 2002. Como todos os casos da doença identificados fora da Península Arábica tinham histórico de viagem ou contato recente com viajantes procedentes de países do Oriente Médio, a doença passou a ser designada como Síndrome Respiratória do Oriente Médio e difundida mundialmente através da sigla MERS (do inglês: *Middle East Respiratory Syndrome*), sendo o novo vírus nomeado de MERS-CoV (i.e., Coronavírus associado à MERS).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o MERS-CoV foi responsável por 2.494 casos confirmados de MERS e 858 óbitos, revelando altíssima letalidade (em torno de 35%).<sup>5</sup> Embora muito se especule sobre a origem do SARS-CoV e MERS-CoV a hipótese mais aceita é a origem zoonótica, isto é, transmissão de origem animal (doméstico ou silvestre) para humanos. Particularmente, através de morcegos como hospedeiros primários, sendo a infecção humana mediada por hospedeiros intermediários, tais como o civeta (*Paguma larvata*) para SARS-CoV e camelos dromedários para MERS-CoV.<sup>6-9</sup>

Dezessete anos após o surgimento do SARS-CoV e sete anos após a identificação do MERS-CoV, um novo coronavírus foi descoberto. Inicialmente nomeado de 2019-nCoV, o vírus foi posteriormente batizado pelo nome SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, constituindo o sétimo tipo de coronavírus conhecido por infectar humanos (HCoV). Semelhantemente ao SARS-CoV e ao MERS-CoV, o SARS-CoV-2 pode causar doença respiratória aguda grave em humanos.<sup>3</sup> Enquanto os outros HCoV (i.e., HKU1, NL63, OC43 e 229E) são responsáveis por resfriados em todo o mundo, com raros casos de pneumonia e bronquiolite observados em pacientes imunocomprometidos.<sup>3,10</sup>

Por se tratar de uma doença inédita, promovida por um vírus totalmente novo, especulações e questionamentos sobre a origem do SARS-CoV-2 têm sido recorrentes. Estudos apontam que é improvável que o novo coronavírus (i.e., SARS-CoV-2) tenha sido produzido em laboratórios, prevalecendo a hipótese zoonótica. A análise do genoma do SARS-CoV-2 revelou cerca de 96% de similaridade com CoV-RaTG13, isolado de morcego *Rhinolophus affinis* – livremente comercializado no mercado de Wuhan, onde os primeiros casos foram relatados. Apesar dessa alta similaridade, somente um dos seis resíduos de aminoácidos do domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor Binding Domain*) – essenciais para ligação do vírus à proteína humana ECA-2 – são compartilhados entre eles. Fato que leva à teoria de existência de um hospedeiro intermediário. Além da ligação de alta afinidade a proteína humana ECA-2, outra característica particular do SARS-CoV-2 é a presença de subunidade rica em resíduos de arginina (RRAR), localizada entre a junção de S1 e S2 (também conhecido como sítio de clivagem pela furina), que potencializa o potencial infectivo do vírus por ação de proteases da célula hospedeira. Subunidade que está ausente nos coronavírus encontrados em morcegos. Segundo pesquisadores, o vírus precursor do SARS-CoV-2 poderia ter adquirido o sítio polibásico (RRAR) após mutações e transferência zoonótica.<sup>11-13</sup> Há evidências de que os pangolins – mamíferos da ordem *Pholidota* que vivem em zonas tropicais da Ásia e da África – comercializados ilegalmente em mercados Chineses, seriam reservatórios naturais de coronavírus e do próprio SARS-CoV-2.<sup>14</sup>

O status pandêmico da COVID-19 foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020.<sup>15</sup> Dados

epidemiológicos sugerem que cerca de 80% dos infectados pela COVID-19 se recuperarão sem a necessidade de tratamento especial, enquanto 20% podem desenvolver a forma grave da doença. O prognóstico mais desfavorável está associado a pacientes com comorbidades prévias, a exemplo de obesos, imunossuprimidos, cardiopatas, nefropatas, pneumopatas e idosos. Neste cenário, o impacto da COVID-19 no Brasil pode ser particularmente desastroso, haja vista que no país mais da metade da população (55,7%) tem excesso de peso, 12,5 milhões são diabéticos (segundo dados da Federação Internacional de Diabetes para 2017) e mais de 50 milhões apresentam algum tipo de doença cardiovascular.<sup>16-18</sup>

Segundo a OMS a taxa de mortalidade da COVID-19 é de 3,4%, podendo variar de acordo com as características de cada país. Já a letalidade entre os pacientes que necessitam de internação hospitalar varia entre 11 e 15%. Estes números estão diretamente relacionados com as complicações graves, de natureza sistêmica, decorrentes da infecção pelo SARS-CoV-2. Recentemente, a COVID-19 foi definida como uma doença inflamatória sistêmica desencadeada por infecção viral.<sup>19</sup>

Desde os primeiros pacientes infectados por SARS-CoV-2 reportados em dezembro de 2019 (em Wuhan na China) até 11 de setembro de 2020, 28.316.230 (vinte e oito milhões trezentos e dezesseis mil e duzentos e trinta) casos de COVID-19 foram diagnosticados em todo mundo, com relatos de 912.212 (novecentos e doze mil duzentos e doze) mortes. Quadro que revela as proporções épicas da doença, de crise sanitária única e impacto socioeconômico incontestável. Para contribuir na solução deste enorme problema de saúde pública, a comunidade científica mundial tem trabalhado na busca de vacinas e de tratamentos farmacológicos para a COVID-19.<sup>20</sup>

Embora muitos avanços tenham sido relatados, a COVID-19 segue sem tratamentos específicos e eficazes. Neste cenário, a presente revisão se insere com o objetivo principal de revisar o processo de infecção viral e os alvos terapêuticos potenciais para o desenho, descoberta e desenvolvimento de novos fármacos anti-COVID-19.

## 2. Processo de Infecção Viral

Em contraste com os outros parasitas, os vírus são estruturas obrigatoriamente intracelulares e

possuem como principal característica a replicação viral dependente de uma célula metabolicamente ativa, para originar novas partículas virais. Por conta desse importante processo replicativo e pelo tropismo viral, traduzido nas diferentes proteínas residentes no envelope viral, os vírus conseguem infectar todas as formas de vida, incluindo, outros vírus. A diversidade populacional e sua constante evolução, é explicada pela alta capacidade de ocorrência de fenômenos de mutações, recombinações e reagrupamentos genéticos somado a outros fatores.

Vírus constituídos geneticamente de RNA tendem a evoluir mais rapidamente do que os constituídos de DNA, característica explicada pelo maior índice de erros durante a replicação via RNA polimerase ou transcriptase reversa, o que origina acúmulo de mudanças evolutivas via mutações gênicas. Além dos fatores genéticos, as diferentes formas e afinidades de interações vírus-receptor do hospedeiro são fatores determinantes para concluir a capacidade de um determinado vírus em estabelecer ou não um quadro fisiopatológico, além de regular a capacidade de existir mecanismo transmissor entre hospedeiros de espécies distintas, como é o caso do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.<sup>21</sup>

A partir de amostras clínicas de pacientes chineses infectados por SARS-CoV-2 seu genoma viral foi elucidado. Ele consiste em uma fita simples de RNA polaridade positiva, com aproximadamente 29,9 kb composto por um número entre 6 - 11 quadros de leituras abertos (ORF do inglês *open reading frame*), que são as regiões gênicas precursoras de proteínas não estruturais (nsp), estruturais (sp), e acessórias.<sup>22</sup>

As estratégias de replicação de um β-coronavírus, como é o caso do SARS-CoV-2, são específicas e complexas pelo fato de novos RNA genômicos e subgenômicos serem sintetizados a partir de um mesmo molde. O processo se resume na transcrição e tradução inicial do RNA genômico em uma poliproteína precursora, que é processada em proteínas não estruturais. Posteriormente, o RNA genômico é utilizado como molde por uma replicase viral dependente de RNA (RpRd ou nsp 12) para a transcrição completa de uma fita simples RNA negativa que servirá como molde para transcrição de RNA mensageiros subgenômicos, que serão utilizados para codificação de proteínas estruturais virais e transcrição de novos RNA genômicos para

formação de novos vírions.<sup>21</sup> Através da análise de homologia genética entre os quatro gêneros de coronavírus relata-se que SARS-CoV-2 possui 96,2% de homologia com CoV-RaTG13, encontrado em morcegos, e 79,5% com o SARS-CoV.<sup>22</sup> Entre as regiões divergentes no genoma de SARS-CoV e SARS-CoV-2 destacam-se as substituições de nucleotídeos encontradas no gene responsável pela codificação do domínio de ligação ao receptor (RBD do inglês *Receptor Binding Domain*) da glicoproteína S (ou proteína spike) e modificações nos genes responsáveis pela indução inflamatória e codificação de proteínas estruturais que inibem a expressão de interferons (orf3a e orf8).<sup>23</sup>

Estudos relatam que o genoma do SARS-CoV-2 apresenta uma sequência de doze nucleotídeos fundamentais para as características únicas frente a seus antepassados. Sugere-se que esses doze nucleotídeos carregam a chave genética principal para explicação dos mecanismos de adesão e penetração viral, onde o domínio S1/S2 da glicoproteína S apresenta uma região de reconhecimento pela proteína furina do hospedeiro (denominada PRRARSV), com um sítio de clivagem por esta protease. Portanto, diferentemente de outros coronavírus, o SARS-CoV-2 possui habilidades de infecção viral únicas e complexas.<sup>24</sup>

### 2.1. Adesão, penetração e desnudamento viral

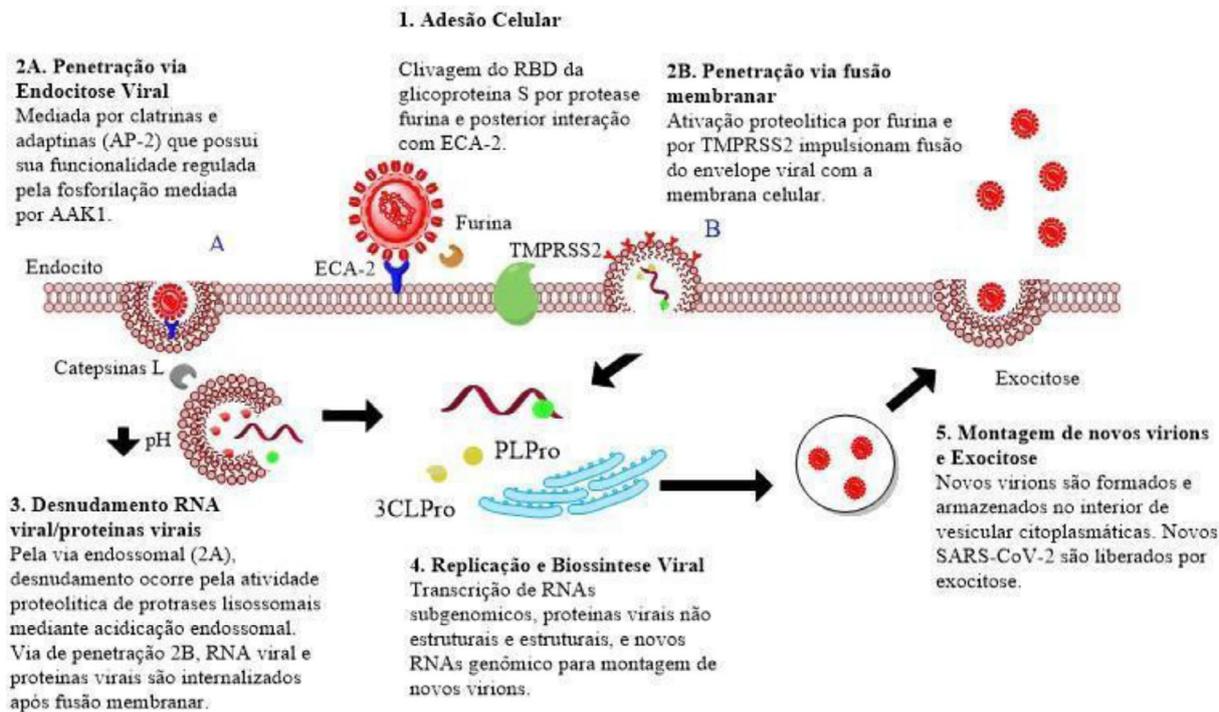
O ciclo replicativo do SARS-CoV-2 (Figura 1) inicia-se com a interação da glicoproteína S – responsável pela característica conformacional em *coroa* da família *Coronaviridae* (como citado anteriormente), que está localizada no envelope viral – com o receptor celular ECA-2 (do inglês *angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2), localizado na superfície da célula alvo. O receptor ECA-2 consiste em uma enzima do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS) que possui dois domínios ativos.

A ligação entre a glicoproteína S e a ECA-2 é responsável pelo tropismo do vírus pela célula hospedeira, propiciando a etapa de adesão do vírus à célula.<sup>24,25</sup> As glicoproteínas S são passíveis de variações conformacionais, expondo ou escondendo seus domínios de ligação com o receptor (RBD) e assim permitindo sua interação com a ECA-2.<sup>26</sup> Estruturalmente, a glicoproteína S divide-se em quatro

diferentes regiões: domínio transmembranar; curto domínio citoplasmático; subunidades S1 (equivalente ao domínio N-terminal) – responsável pela ligação ao receptor celular ECA-2 – e a subunidade S2 (equivalente ao domínio C-terminal) – envolvida no mecanismo de penetração viral. A subunidade S1 possui RBD com até 200 resíduos de aminoácidos com dois subdomínios diferentes: um interno (núcleo) e um externo. O subdomínio externo (contendo o RBD) possui dois loops expostos em sua superfície, o que permite a interação com receptor ECA-2 e sua ativação proteolítica por proteases virais. A furina e TMPRSS2 (i.e, *serina-serina protease transmembranar*) são as proteases envolvidas na via de fusão membranar. Em contrapartida, as catepsinas lisossomais são as proteases envolvidas no processo de ativação da glicoproteína S na via de penetração endossomal dependente de receptor, que também conta com a prévia ativação pela furina para interação com a ECA-2 (Figura 1).<sup>27</sup>

O processo de entrada do SARS-CoV-2 é altamente regulado. Estudos apontam que a interação da glicoproteína S ao receptor ECA-2 é uma etapa primordial, porém não garante a penetração viral de forma independente. A glicoproteína S precisa ser ativada por clivagem proteolítica entre as subunidades S1/S2, catalisada especialmente pela furina, para que ocorra mudança conformacional em sua subunidade S2, e permita a interação do domínio RBD com o receptor ECA-2 e consequente penetração viral na célula hospedeira.<sup>27-30</sup>

O passo crítico em qualquer infecção viral envolve a penetração das partículas virais no citosol. Para isso, a maioria dos vírus utiliza do tráfico de membrana endocítica da célula hospedeira. Enquanto as vias endocíticas canônicas em células mamíferas envolvem brotação de vesículas revestidas de clatrina, com consequente formação de endossoma primário → endossoma secundário → e lisossomo, as vias não-canônicas são mediadas por caveola e o caveossomo formado é endereçado diretamente para o retículo endoplasmático e aparato de Golgi. Os vírus têm sido relacionados com a utilização de todos os tipos citados. Detalhes mecânicos dessas vias podem variar consideravelmente entre os tipos de células e a diversidade de endocitose no epitélio das vias aéreas não é totalmente elucidada.



**Figura 1.** Ilustração esquemática das etapas de infecção viral pelo SARS-CoV-2

A compreensão da entrada do vírus no trato respiratório pela via endocítica pode, portanto, oferecer uma estratégia terapêutica promissora para tratar infecções virais. No que diz respeito aos coronavírus, as evidências atuais sugerem que o modo de entrada pode variar entre os vírus e tipos de células hospedeiras, e pode incluir endocitose dependente de clatrina ou cavéola e mecanismo independentes envolvendo balsas lipídicas.<sup>31</sup> A endocitose mediada por clatrina é iniciada pelo recrutamento de complexos adaptinas (AP-2) para locais saturados e sensíveis à protease na membrana plasmática e regulada pela quinase associada ao adaptador AP2, isto é, pela AAK1 (do inglês *Adaptor-associated protein kinase 1*). Os complexos AP-2 interagem diretamente nos domínios citoplasmáticos ricos em resíduos de tirosina receptores para afetar sua concentração em poços revestidos e coordenar a montagem de clatrina. A montagem da clatrina em uma rede é, por sua vez, pensada para conduzir a invaginação da membrana e facilitar a formação da vesícula. Após a montagem do revestimento, a fenda revestida se contrai e se solta da membrana plasmática para formar uma vesícula revestida por clatrina. Este ciclo é concluído pela clivagem das proteínas do revestimento facilitada pela ação de ATPase e Hsc70, que liberam os componentes do revestimento para mais uma

rodada de endocitose mediada por clatrina.<sup>32</sup> Tanto o SARS-CoV quanto o SARS-CoV-2 parecem exigir endocitose, enquanto o SARS-CoV pode ser endocitado por mais de uma via, dependendo da linhagem celular. No entanto, há pouco conhecimento sobre os detalhes envolvidos no modo de entrada (i.e., penetração) do vírus nas células do pulmão humano. Por conseguinte, é imprescindível considerar o tráfico endocítico de SARS-CoV-2 no contexto do tipo de célula hospedeira.

Evidências preliminares sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 pode começar no trato respiratório superior, por exemplo, no epitélio nasal. Para estabelecer quais vias endocíticas provavelmente operarão em células epiteliais nasais e pneumócitos é necessário observar o perfil de expressão local para as principais proteínas endocíticas. Enquanto as células epiteliais nasais expressam abundantemente uma grande variedade de marcadores endocíticos, sugerindo a presença de múltiplas vias ativas, os pneumócitos apresentam um padrão de expressão mais restrito, com algumas proteínas-chave associadas à endocitose encontradas em baixas concentrações ou mesmo ausentes. É importante ressaltar que GTPase, que participa da endocitose através de vesículas revestidas de clatrina e cavéola, é abundante em epitélio

nasal, mas indetectável em pneumócitos. Em contraste, existem níveis de expressão médio a alto de proteínas envolvidas na macropinocitose, como a proteína de ligação terminal C (CtBP) 1 e 2 e Pak1. Portanto, alguns autores sugerem que a macropinocitose pode ser uma importante via endocítica em pneumócitos.<sup>31</sup>

Uma vez internalizado dentro do endossomo, SARS-CoV-2 possui duas formas de desencadear a infecção: 1) através da clivagem da glicoproteína S por proteases do endossomo tardio – ativando-a e acarretando na fusão da partícula viral à membrana da vesícula e consequente liberação de seus componentes internos no citosol, etapa conhecida como desnudamento – 2) ou através da total degradação de suas proteínas estruturais pelo endolisossomo, que através da intensa acidificação endossomal, propicia a ativação de catepsinas lisossomais com ação proteolítica, possibilitando a liberação do RNA no citosol.<sup>33</sup>

Após as etapas de adesão e penetração (esta última dependente de processos de fusão ou endocitose) ocorre a etapa de desnudamento, na qual há a liberação do material genético (RNA) do vírus no citoplasma da célula hospedeira. O vírus carrega consigo importantes proteínas virais necessárias para sua sobrevivência inicial na célula alvo, iniciando o processo de replicação viral.

O nucleocapsídeo contém proteases virais do tipo papaína (nsp3 - PLPro), proteases do tipo quimotripsina (3CLPro), também conhecidas como proteases principais (do inglês: *main proteases*, MPro), proteases nsp7 e nsp8. Além das proteínas participantes da replicação viral, nsp12 (RNA polimerase dependente de RNA), nsp13 (helicase), nsp9 (RNA replicase), entre outras.<sup>28,34</sup>

## 2.2. Síntese de poliproteínas virais

Inicialmente, o genoma viral codifica duas poliproteínas virais precursoras (ORF1a e ORF1ab).<sup>34</sup> A diferença entre as duas poliproteínas ORFs codificadas se origina pelo posicionamento ribossomal variável durante a tradução proteica. A ORF1a é traduzida a partir do posicionamento ribossomal no códon AUG inicial, enquanto ORF1ab é traduzida através de um evento de deslocamento de quadro (do inglês *frameshift*).<sup>20</sup> As poliproteínas ORF1a e ORF1ab, denominadas pp1a e pp1ab são clivadas em 16

proteínas não estruturais (nsp1 à nsp16) por ação catalítica de proteases virais tais como: 3CLpro ou Mpro e proteases do tipo papaína (PL1pro – PL2pro) (Figura 1).<sup>34-36</sup>

As proteínas não estruturais formadas (nsp) participam da replicação viral nas etapas de formação do complexo replicação-transcrição (RTC), na montagem de novos vírions e no suporte à RNA polimerase RpRd (nsp 12) para iniciar a transcrição de uma fita simples de RNA negativo, a partir do RNA genômico viral.<sup>37</sup> O complexo replicação-transcrição (RTC, do inglês *replicase-transcriptase complex*) organiza-se em vesículas de membrana dupla (DMVs do inglês *double membrane vesicles*) originadas pela reorganização complexa das membranas do retículo endoplasmático.<sup>37,38</sup>

A expressão de proteínas estruturais e proteínas acessórias pode ser explicada pelo resultado da inserção das proteínas nsp3 e nsp5 na porção 3'- proximal dos domínios de genoma da transcrição presente nos RNAs subgenômicos.<sup>39</sup>

## 2.3. Replicação genômica e montagem de novos vírions

A formação de fitas simples de RNA negativo concentra uma importante etapa no ciclo replicativo, pois o mesmo trata-se do molde para a transcrição de RNAs subgenômicos necessários para codificação de proteínas acessórias e estruturais, além de ser o ponto de partida para transcrição de novos RNAs genômicos positivos destinados a montagem de novos vírions.<sup>25</sup> O processo de montagem dos novos vírions não é completamente elucidado. Estudos sugerem que tanto o SARS-CoV quanto o SARS-CoV-2 induzem o mesmo tipo de alterações nas estruturas membranares das células, assim como todos os vírus do gênero coronavírus.<sup>40</sup>

O brotamento do nucleocapsídeo que ocorrerá dentro do complexo de Golgi é o que torna possível a formação dos novos vírions (Figura 1). O citoplasma das células infectadas contém um conjunto de proteínas denominadas *Nidovirales replicases*, que fazem o papel de âncora para as DMVs com a membrana plasmática. As DMVs se fundirão com as vesículas empacotadas (VPs do inglês *vesicle packets*), as quais podem conter até 25 outras vesículas dentro de si, onde se transformam em vacúolos citoplasmáticos contendo as DMVs, as VPs e as novas partículas virais.<sup>39</sup>

## 2.4. Exocitose de novos vírions

Devido semelhanças estruturais entre o SARS-CoV e SARS-CoV-2, especula-se que o entendimento para a exocitose (Figura 1) seja igualmente equivalente, como mencionado por Shereen *et al.*<sup>24</sup> O mecanismo de exocitose de novos vírions formados a partir do SARS-CoV-2 ainda não foi elucidado. Sugere-se que ocorra em um compartimento citoplasmático. Através de técnica de imunofluorescência foram observados traços de proteínas não estruturais (nsp) acumulados na estrutura denominada de ERGIC (do inglês *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*).<sup>41</sup>

## 3. Fisiopatologia da Doença

As manifestações clínicas da COVID-19 incluem febre, dispneia, tosse seca, diarreia, mialgia e fadiga; além da diminuição da contagem de leucócitos e linfócitos (leucopenia e linfopenia, respectivamente), podendo evoluir para casos mais graves da doença, como pneumonia viral e síndrome respiratória aguda severa (SARS).<sup>2,38</sup>

Fatores relacionados à comorbidade do indivíduo infectado são importantes para a incidência de casos graves da COVID-19. Condições crônicas, como diabetes, pneumopatias, hipertensão, doenças cardiovasculares e renais comprometem a eficácia da resposta imune inata e adaptativa do paciente, resultando em maior dificuldade no combate à infecção viral pelo sistema imunológico.<sup>42,43</sup>

A partir de estudos que sugerem mecanismos fisiopatológicos similares entre o SARS-CoV e MERS-CoV, têm sido propostos os mecanismos de infecção pelo SARS-CoV-2. Após adesão mediada pela interação entre a glicoproteína S e o receptor ECA-2, ocorre a penetração da partícula viral na célula hospedeira, seguida de desnudamento e rápida replicação viral, desencadeando modificações no epitélio vascular e alveolar, através de intensa apoptose e/ou piroptose de células infectadas (Tabela 1). Dessa forma, a apoptose e os danos no epitélio vascular e alveolar contribuem para o extravasamento de conteúdos celulares, incluindo proteínas virais presentes no interior das células-alvo e extravasamento de leucócitos do plasma sanguíneo para o

interior da matriz pulmonar. Por conseguinte, o sistema imune inato é altamente estimulado através de moléculas associadas a patógenos padrões (PAMPs) e de células apresentadoras de antígenos virais (APC), desencadeando uma resposta imunológica primária com a secreção de importantes citocinas pró-inflamatórias.<sup>43</sup>

Estudos publicados sobre as características clínicas da COVID-19 relatam que 82,1% dos pacientes foram acometidos de linfopenia periférica, e 33,7% de leucopenia periférica. Dados possivelmente relacionados a provável infiltração de células imunes na matriz pulmonar por modificações na permeabilidade vascular e/ou apoptose/piroptose dessas células.<sup>44</sup>

Estudos demonstram a presença de altas concentrações no soro de pacientes em estágio grave da COVID-19 de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, principalmente dímero-D (marcador de degradação de fibrina, indicativo de dano tecidual), IL-6, proteína sérica-C, IL-1 $\beta$ , IL-1R $\alpha$ , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF básico, GCSF, GMCSF, IFN $\gamma$ , IP10, MCP1, MIP1A, MIP1B, PDGF, TNF- $\alpha$  e VEGFR. A maciça liberação de mediadores inflamatórios está relacionada a intensa estimulação de monócitos/macrófagos e de diferentes subgrupos de células T.<sup>42,45,46</sup>

O ciclo infectivo do SARS-CoV-2, baseado em estudos já realizados com SARS-CoV, evidencia diversos pontos que propiciam a evasão do vírus ao sistema imune do indivíduo. Por exemplo, o transporte intercelular de novos vírions com o auxílio de proteínas virais, sem que o vírus seja reconhecido por anticorpos neutralizantes é uma estratégia que dificulta o efeito benéfico da ativação da resposta inflamatória no organismo e consequente depuração viral, particularmente afetada em pacientes com comorbidades.<sup>47</sup>

Portanto, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2 estimula a produção excessiva de citocinas inflamatórias ou pró-inflamatórias, recebendo o nome de “tempestade de citocinas” (do inglês *cytokine storm*). A liberação de tais mediadores é responsável pelo intenso dano tecidual e celular, pela inflamação pulmonar e sistêmica; levando a quadros de pneumonia viral letal, sepse viral e síndrome respiratória aguda severa (Tabela 1). Além de contribuir para incidência de prováveis complicações hepáticas, cardiovasculares e neurais.<sup>45,48</sup>

Um fator agravante da doença é a exaustão leucocitária, com subtipos de linfócitos CD4<sup>+</sup> e

**Tabela 1.** Sumário dos possíveis mecanismos inflamatórios desencadeados pela infecção pelo SARS-CoV-2. Propostas baseados em estudos realizados com SARS-CoV. Adaptado de Fu e colaboradores (2020)<sup>43</sup>

Possíveis mecanismos inflamatórios relacionados à COVID- 19	
Apoptose / Piroptose celular	↑ Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias; ↑ Leucopenia e Linfopenia;
Desregulação e intensa desagregação de ECA-2	↑ Dano alveolar tecidual; ↑ Aumento da permeabilidade vascular; ↑ Disfunção Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
Ativação do Sistema Complemento	↑ Polarização e acúmulo de macrófagos/monócitos; ↑ Produção de MCP1- e IL-8;
Captação celular do complexo vírus-anticorpo via FcR	↑ Danos Celulares; ↑ Lesão pulmonar aguda.

CD8<sup>+</sup> efetuando função citotóxica, devido à alta liberação de IL-6, que culmina no aumento da proliferação celular e intensa liberação de IL-8, que promove o recrutamento de novas células. Por conseguinte, enorme quantidade de células são atraídas para o foco infeccioso e proliferam diante do estímulo de citocinas liberadas a partir da infecção viral. Desta forma, iniciam a produção de GM-CSF+IFN- $\gamma$  que irão contribuir com a diferenciação de células da imunidade inata e aumentar a liberação de IL-6 e a atividade de linfócitos T.<sup>49</sup>

Outro processo relevante sugerido como consequência da infecção por SARS-CoV-2 é a desregulação do sistema renina-angiotensina. A ECA-2, usada como receptor para ligação do vírus a célula hospedeira, está envolvida com a biossíntese de angiotensinas vasodilatadoras (Ang1-7), auxiliando no controle da homeostasia da função vascular em tecidos como coração, pulmão, cérebro e rins.<sup>50</sup> Sua internalização decorrente da ligação com a glicoproteína S resulta em desregulação do sistema-renina-angiotensina, contribuindo para a inflamação e para complicações circulatórias e vasculares da COVID-19.<sup>51</sup>

Além disso, estudos apontam que a liberação de anticorpos neutralizantes, pela resposta imune adaptativa na fase aguda da doença, pode não ser suficiente para neutralização antiviral completa. Contudo, o complexo anti-S-IgG-vírus formado pode ser internalizado mediante interação e ativação dos receptores Fc (FcR), presentes na membrana de linfócitos B, células dendríticas foliculares, células natural Killer, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, plaquetas e mastócitos. Essa captação, disponibiliza a

partícula viral no meio intracelular aumentando a proliferação viral, a produção de citocinas pró-inflamatórias via ativação do sistema complemento, e consequentemente, intensifica os danos celulares e lesões pulmonares.<sup>43</sup>

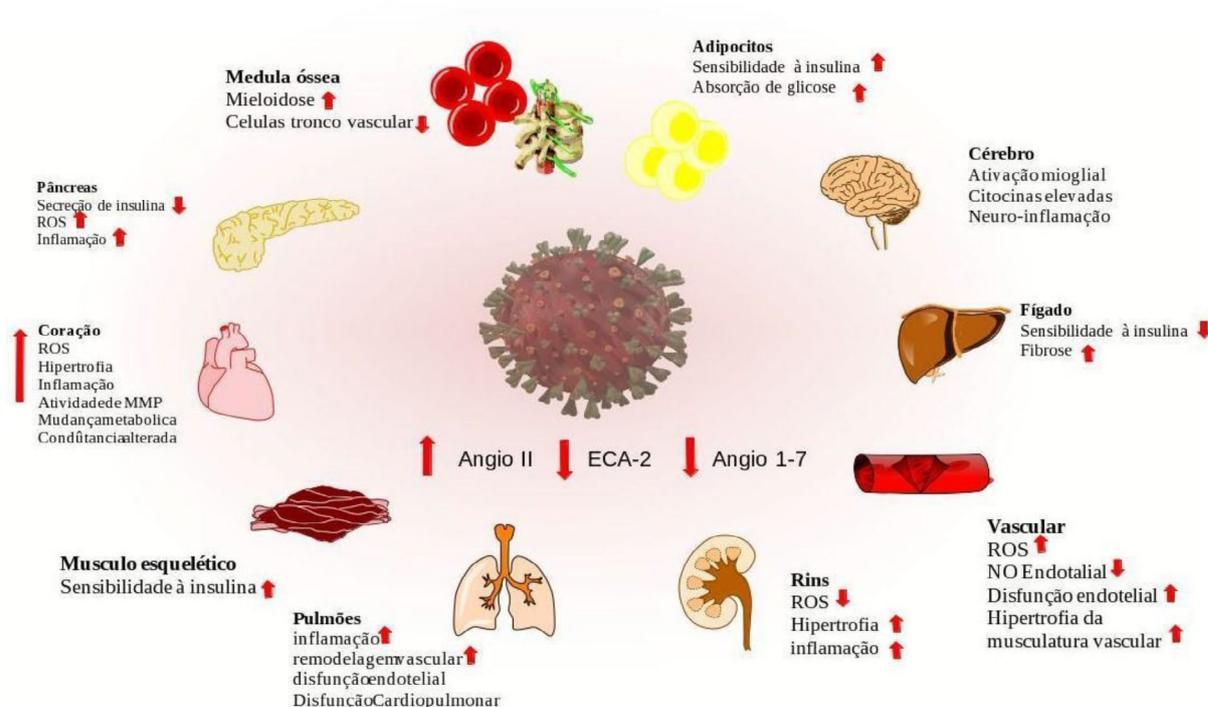
### 3.1. Aspectos respiratórios

Lesões pulmonares graves induzidas pela COVID-19 podem estar relacionadas à resposta imunológica humoral por anticorpos anti-glicoproteína S nos pulmões e pela alta concentração de quimiocinas MCP-1 e IL-8.<sup>52</sup> A liberação destes mediadores, que terão respostas dependentes da célula-alvo e da concentração plasmática, propicia a continuidade do ciclo vicioso, com quimiotaxia de células e consequente ativação e liberação de mais mediadores inflamatórios.

Portanto, resultando em resposta citotóxica descontrolada na tentativa de impedir a infecção pelo vírus, com graves danos celulares e teciduais. A exemplo da perda maciça de células pulmonares, através de lise celular, com concomitante extravasamento do conteúdo intracelular, tornando os espaços alveolares tomadas de exsudato proteico, com formação de edema pulmonar e de tecido fibrótico, resultando na diminuição da capacidade bronquiolar de realizar trocas gasosas, observada clinicamente pela diminuição da saturação de oxigênio e dispneia (*i.e.*, falta de ar) (Figura 2).<sup>53</sup>

### 3.2. Aspectos cardiovasculares

A enzima conversora de angiotensina (ECA-2) é uma glicoproteína integral de membrana expressa na maioria dos tecidos, embora em elevado nível



**Figura 2.** Esquematisação dos aspectos fisiopatológicos gerais da COVID-19. Adaptado de IMAI e colaboradores (2005)<sup>63</sup>

nos pulmões, coração, rins e endotélio vascular. Ela faz parte do sistema renina-angiotensina (RAS) e é responsável pela conversão da angiotensina II (Ang II) em angiotensinas 1-7 (Ang 1-7).

Estudos sugerem a importância vital da ECA-2 na regulação dos níveis locais de Ang II (vasoconstritora) e Ang 1-7 (vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antioxidantes), contribuindo para a homeostasia cardíaca e vascular.<sup>51</sup> A ligação da glicoproteína S viral ao receptor ECA-2 resulta na diminuição de sua expressão, pois a interação desencadeia sinalização intracelular que culmina na endocitose do receptor (internalização), ocorrendo, ainda, a diminuição da produção de ECA-2 à níveis genômicos, resultando na perda da função catabólica da enzima.<sup>43,54</sup> Por conseguinte, o equilíbrio fisiológico do RAS é afetado, desencadeando perda de sensibilidade de barorreceptores, responsáveis pelo controle fino da frequência cardíaca e pressão arterial; aumento da vasoconstrição, promovendo incremento da resistência vascular periférica e consequente aumento da pressão arterial sistêmica (PAS); retenção de sódio, que favorece a retenção hídrica, com subsequente aumento do volume sanguíneo e da PAS. Em conjunto

estas alterações resultam em quadros de hipertensão e arritmias, agregando-se ao maior estresse oxidativo e injúria inflamatória do tecido cardiovascular.<sup>55</sup> Biomarcadores como troponinas (responsáveis pela contração do músculo cardíaco), trombinas (responsáveis pela formação de coágulos) e peptídeo natriurético cerebral (marcador de resposta ao estresse do miocárdio devido a altos estiramentos e sobrecarga cardíaca) são encontrados em níveis elevados em pacientes graves de COVID-19 (Figura 2).<sup>56</sup>

Em linhas gerais são propostos dois mecanismos de danos vasculares promovidos pela infecção pelo SARS-CoV-2. O primeiro, dito direto, é consequência da resposta imunitária citotóxica em decorrência da infecção viral. O segundo, denominado mecanismo indireto, se estabelece pela perda de controle barométrico, aumento da pressão vascular e inflamação dos vasos sanguíneos. As alterações cardiovasculares, mediadas pelo desequilíbrio do RAS e pela natureza da resposta citotóxica e inflamatória da infecção pelo SARS-CoV-2, já comentadas, são responsáveis pela hipertensão sistêmica, arritmias cardíacas, formação de trombos e aumento de síndromes coronarianas agudas.<sup>55</sup>

### 3.3. Aspectos neurais

Embora menos estudado, acreditava-se na possibilidade de infecção neural por SARS-CoV-2. A hipótese prevalente prever que a partir da infecção nasal, o vírus invada células da mucosa, e posteriormente, neurônios olfativos, além de neurônios do sistema nervoso entérico, responsáveis pelo peristaltismo intestinal.<sup>57</sup> Sintomas clínicos como a falta de paladar (disgeusia) e de olfato (anosmia) são reportados por pacientes com COVID-19 e são tidos como sinal de infecção das células nervosas pelo vírus.<sup>58</sup> Os sintomas neurais mais frequentes são dor de cabeça, tontura e mialgia, podendo está ou não associados a quadros de isquemia, sangramento e convulsões causados pelas complicações cardiovasculares e respiratórias, as quais contribuem para a modificação da barreira hematoencefálica, menor disponibilidade de oxigênio e consequente aumento da pressão sanguínea. Outros sintomas como meningite, encefalite, neurite óptica são relatados, mas os processos fisiopatológicos que os desencadeiam não são totalmente elucidados (Figura 2).<sup>59</sup>

### 3.4. Aspectos renais

De acordo com a literatura, a homeostase líquida do organismo é mantida pelo sistema cardiovascular e renal, que tem uma comunicação íntima para o controle do volume do líquido extracelular (LEC). Como já mencionado na infecção por SARS-CoV-2, danos cardiovasculares relevantes e o desbalanço de angiotensinas são dois fatores que juntos acarretam em uma sobrecarga renal, na tentativa de diminuir a pressão periférica. Porém, pelos efeitos da angiotensina II esse mecanismo compensatório será inibido e haverá retenção de sódio e água agravando os efeitos cardiovasculares e aumentando a demanda de filtração glomerular renal. Ademais, os efeitos teciduais da angiotensina II sobre os rins causará sérios processos inflamatórios que comprometerão o processo de filtração uma vez que a permeabilidade celular estará alterada (Figura 2).<sup>60</sup> Vários modelos de nefropatia mostraram que ECA-2 está relacionada com redução de danos nos glomérulos e túbulos renais, bem como redução da fibrose via degradação de angiotensina II. A lesão renal aguda (LRA) é pouco frequente no contexto de infecção leve a moderada por SARS-CoV-2 (5%). Evidências

recentes mostram que LRA é mais comum em pacientes em estado crítico e trata-se de uma das complicações extrapulmonar mais comum, assim como a lesão cardíaca e disfunção hepática. Devido à sobrecarga e os elevados níveis de substâncias tóxicas acumuladas no organismo, é necessária a implementação de hemodiálises para evitar cronificação das complicações que levarão ao óbito. Isso sugere que anormalidades renais são mais comuns do que o esperado e estão associadas com maior mortalidade, mesmo quando estão presentes como manifestações subclínicas.<sup>61,62</sup>

## 4. Potenciais Alvos Terapêuticos

Dadas as características fisiopatológicas da infecção pelo SARS-CoV-2, as estratégias para o tratamento da COVID-19 podem agrupar-se em opções sintomáticas – que controlem majoritariamente a resposta inflamatória exacerbada, prevenindo os danos teciduais – e opções antivirais – pautadas na ação sobre alvos moleculares chave no processo de infecção e replicação viral. Com base no processo de infecção viral, discutido anteriormente, proteínas/enzimas envolvidas em etapas essenciais dos processos de adesão, penetração, desnudamento, biossíntese e liberação viral são alvos moleculares potenciais para a intervenção terapêutica e obtenção de novos fármacos antivirais para o tratamento da COVID-19. Estes alvos podem ser proteínas/enzimas virais ou da célula hospedeira; registrando-se a maior toxicidade seletiva das abordagens que elejam alvos ausentes ou que não participem de processos chave na fisiologia da célula humana.

### 4.1. Serina-serina protease transmembranar (TMPRSS-2)

#### 4.1.1. Função biológica

A serina-serina protease transmembranar (TMPRSS-2) é uma proteína de membrana do tipo II de passagem única contendo 492 aminoácidos e 70 kDa. É expressa na superfície da célula, regulando interações célula-célula e matriz-célula, tanto em tecidos saudáveis quanto doentes. A TMPRSS2 possui domínios intra- e extracelulares, podendo funcionar como receptor

para ligantes específicos que mediam sinais entre o meio extracelular e interior da célula. O RNAm de TMPRSS2 humano é expresso em muitos tecidos, incluindo próstata, mama, ducto biliar, rim, cólon, intestino delgado, pâncreas, ovário, glândula salivar, estômago e pulmão. Nestes tecidos, a proteína TMPRSS2 e o RNAm são encontrados principalmente nas células epiteliais. É considerada uma serina protease regulada por andrógenos e pode ser encontrada localmente na próstata e superexpressa no epitélio neoplásico prostático.<sup>64</sup> A TMPRSS2 é composta por um domínio transmembranar do tipo II, um domínio de lipoproteína de baixa densidade, um domínio rico em cisteína, um domínio protease e um domínio citoplasmático.

Embora seu papel fisiológico não tenha sido completamente elucidado, trabalhos associam a TMPRSS2 à processos de digestão, remodelamento de tecidos, coagulação sanguínea, fertilidade, respostas inflamatórias, invasão de células tumorais e apoptose.<sup>65</sup>

#### 4.1.2. Contribuição fisiopatológica na COVID-19

A TMPRSS2 é majoritariamente expressa em tecido epitelial do trato respiratório superior, brônquios e pulmões. Sua função fisiológica não é totalmente elucidada, mas trabalhos indicam seu envolvimento na regulação de sódio no epitélio pulmonar, através de clivagem induzida por proteases regulada por canais de sódio.<sup>64,66</sup> Durante o processo de invasão celular, a proteína spike (S) ou glicoproteína S contará com a TMPRSS2, que juntamente com a furina, participa da clivagem proteolítica da glicoproteína S viral permitindo a fusão membranar e consequente penetração do vírus no citoplasma da célula hospedeira. Conforme previamente mencionado, a proteína S propicia a adesão do SARS-CoV-2 à célula hospedeira, após sua ligação ao receptor ECA-2, processo facilitado pela clivagem proteolítica entre as subunidades S1 e S2, catalisada pela furina. Entretanto, a entrada da partícula viral na célula hospedeira requer outra clivagem proteolítica da proteína S, entre os sítios S1/S2 e S2', permitindo a fusão do vírus às membranas celulares, processo dependente da ação catalítica da TMPRSS2.<sup>66,67</sup> Portanto, inibidores da TMPRSS2 tem o potencial de impedir a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira via mecanismo de bloqueio da fusão membranar.<sup>68</sup>

#### 4.1.3. Dados estruturais e homologia

Ainda que a inibição da TMPRSS2 seja uma opção terapêutica muito promissora, estruturas cristalográficas da proteína não estão disponíveis. Desta forma, o desenho de novos fármacos baseados em estrutura, vem sendo aplicados a partir de modelos de homologia da TMPRSS2, usando como proteína molde a calicreína humana (PDB 5TJK).<sup>69</sup> A TMPRSS2 dispõe de um domínio intracelular (resíduos de 1-84), um domínio transmembranar (resíduos 84-106), um domínio de lipoproteína de baixa densidade (LDLRA, resíduos 133-147) e dois domínios extracelulares: o primeiro rico em cisteína (resíduos 148-242) e o segundo de serina protease (resíduos 255-489). A tríade catalítica responsável pela atividade do TMPRSS2 é constituída pelos resíduos de aminoácidos His 296, Asp 345 e Ser 441.<sup>70</sup>

#### 4.1.4. Inibidores de serina protease: camostat e nafamostat

O mesilato de camostat (Foipam®, Figura 3) é um inibidor sintético de serina protease, a exemplo das catepsinas B/L. É produzido no Japão pela Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd., e pela Ono Pharmaceutical. Foi previamente aprovado para o tratamento de carcinoma oral do tipo escamoso, epidermólise distrófica e pancreatite. Em estudos *in vitro*, visando seu reposicionamento para o tratamento da COVID-19, foi demonstrada sua capacidade de inibir a TMPRSS2 em linhagens celulares pulmonares do tipo Calu-3 e de reduzir a infecção causada pelo SARS-CoV-2.<sup>70</sup> Outro inibidor de serina protease, posteriormente demonstrado como capaz de inibir a TMPRSS2 é o mesilato de nafamostat (Buipel®, Figura 3). Semelhante ao camostat, foi aprovado no Japão para o tratamento de pancreatite aguda, sendo considerado um anticoagulante de curta duração por inibir a protease triptase.<sup>71</sup> Em um estudo comparativo entre os dois inibidores, o nafamostat demonstrou ser até 15 vezes mais eficiente que o camostat em inibir a infecção em modelo de células pulmonares infectadas com SARS-CoV-2. Dados que subsidiaram a seleção do nafamostat como um candidato promissor para estudos clínicos contra a COVID-19.<sup>72</sup> Registra-se que ambos fármacos apresentaram capacidade de inibir a tríade catalítica da TMPRSS2 ao interagir com os resíduos His 296, Asp 345 e Ser 441.<sup>73</sup>

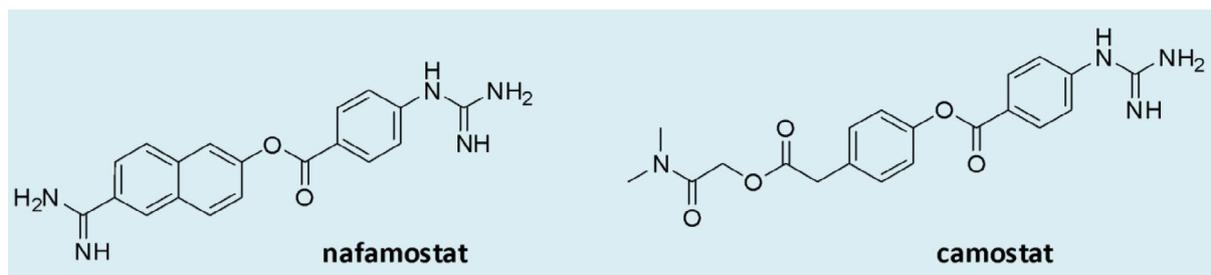


Figura 3. Estrutura química nafamostat e camostat: inibidores de TMPRSS2

## 4.2. Furina

### 4.2.1. Função biológica

A furina é uma enzima da família das pró-proteína convertase do tipo subtilisina (do inglês *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type*, PCSK), classificada como proteína transmembranar do tipo 1, capaz de clivar proteoliticamente outras proteínas humanas ativando-as, a exemplo de hormônios do crescimento, proteínas de adesão, proteínas plasmáticas, etc.<sup>74</sup> Trata-se de uma serino-protease humana utilizada por vírus e bactérias para promover a clivagem e ativação proteolítica de mais de 100 tipos de substratos.<sup>74</sup> Tem papel fisiológico fundamental na embriogênese, proliferação celular, migração e invasão celular. É altamente expressa em tecidos endócrinos, pulmonares, hepáticos e alças intestinais, estando relacionada ao desenvolvimento de quadros fisiopatológicos como o Diabetes Mellitus, hipertensão, obesidade, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia, câncer e doenças neurológicas.<sup>75,76</sup>

### 4.2.2. Contribuição fisiopatológica na COVID-19

Atribui-se à furina função relevante na clivagem da proteína S (ou glicoproteína S) do SARS-CoV-2, auxiliando diretamente a etapa de adesão do vírus ao receptor de membrana sobre as células hospedeiras e contribuindo, indiretamente, para a entrada do vírus na célula (processo de penetração). Tal clivagem proteolítica ocorre entre os segmentos S1 e S2 da proteína S, tornando-os funcionais. O segmento S1 medeia a ligação do SARS-CoV-2 ao receptor ACE-2, enquanto, o segmento S2 é responsável pela fusão com a membrana celular.<sup>77</sup>

### 4.2.3. Dados estruturais e homologia

O sítio de clivagem da furina (FCS, do inglês *furin cleavage site*) na proteína S está presente

apenas no SARS-CoV-2.<sup>78</sup> A clivagem proteolítica ocorre em um espaço entre as subunidades S1 e S2, contendo a sequência de reconhecimento denominada de PRRARSV. Pontualmente, a sequência “PRRA” é exclusiva para SARS-CoV-2.<sup>79</sup> Por não haver dados cristalográficos do FCS, estudos de predição foram realizados e sugerem que estaria localizado entre os resíduos de aminoácidos 682-685.<sup>80</sup> Outros estudos de homologia identificaram o sítio de clivagem da furina (FCS) como aquele contendo resíduos de aminoácidos similares ao do estudo anterior, isto é: Pro681, Arg682, Arg683, Ala684 e Arg685. A partir destes estudos foi descartado o envolvimento dos FCS em qualquer tipo de interação eletrostática com a estrutura da proteína S, o que levou à conclusão da incapacidade da furina de realizar alterações estruturais diretamente na espícula.<sup>81</sup>

### 4.2.4. Inibição da furina como alvo terapêutico

Até o momento não são conhecidos inibidores de furina. Embora, a inibição desta serino-protease possa contribuir para redução da infecção viral, por prejudicar as etapas de adesão e penetração do SARS-CoV-2 na célula hospedeira, a toxicidade proveniente de tal abordagem coloca em xeque a própria estratégia.<sup>78</sup> Entretanto, alguns autores defendem que inibidores de furina possam ser explorados como estratégias no tratamento da COVID-19, desde que planejados para uso não sistêmico.<sup>81</sup>

## 4.3. Protease viral (3CLpro)

### 4.3.1. Função biológica

A protease do tipo 3-quimotripsina (3CLpro) é uma enzima viral, que exerce papel central na mediação da replicação e transcrição viral, tornando-a alvo atraente para o desenvolvimento

de novos antivirais que preencham o requisito da toxicidade seletiva.<sup>82,83</sup> A 3CLpro, também denominada protease principal (Mpro), é uma cisteinil protease presente em  $\beta$ -coronavírus e foi previamente estudada como alvo molecular para o desenho e descoberta de antivirais para o tratamento da SARS e MERS. Como consequência, tornou-se um dos alvos moleculares mais estudados mundialmente em busca de terapias farmacológicas para o tratamento da COVID-19.

#### 4.3.2. Contribuição Fisiopatológica na COVID-19

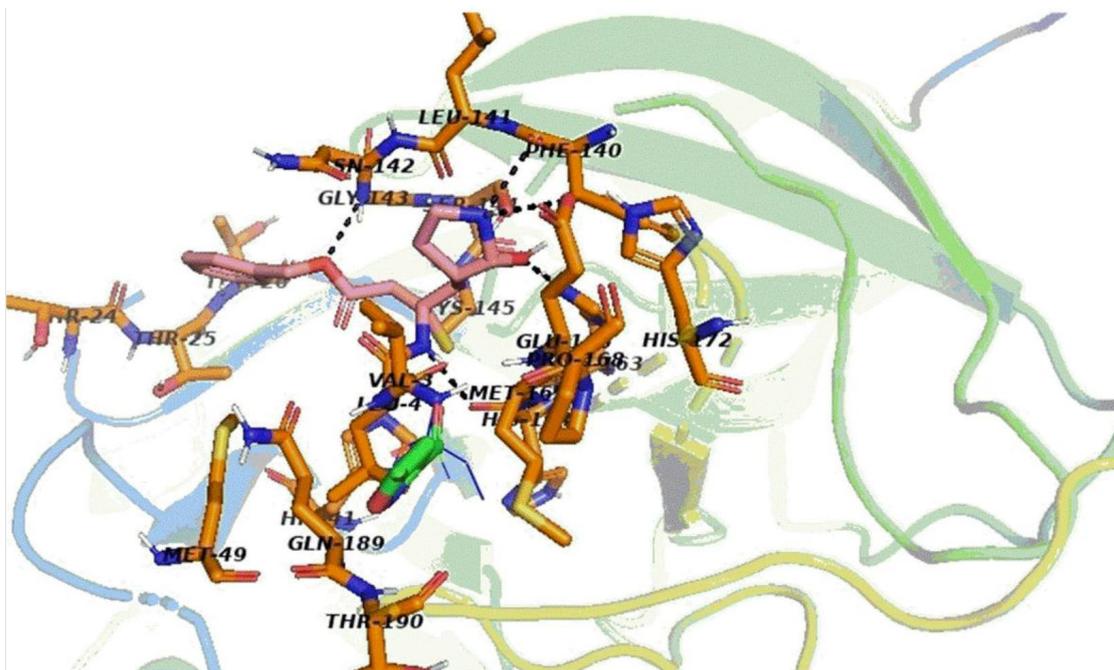
A 3CLpro ou Mpro promove a clivagem proteolítica em 11 sítios diferentes de poliproteínas não funcionais de coronavírus. A partir de tais clivagens são formadas proteínas virais funcionais, incluindo RNA-polimerase dependente de RNA, helicase (proteína de ligação a RNA de fita simples), exoribonuclease, endoribonuclease e 2'-O-tribose-metiltransferase. Todas consideradas essenciais nos processos de replicação e infecção viral. Desta forma, a inibição da 3CLpro ou Mpro emerge como estratégia promissora para intervenção terapêutica e obtenção de novos antivirais contra infecções por coronavírus.<sup>82-85</sup>

#### 4.3.3. Dados Estruturais e Homologia

Recentemente, a 3CLPro ou Mpro teve sua estrutura tridimensional elucidada por estudos de difração de raios-X, sendo co-cristalizada com inibidor da classe alfa-cetoamida (Figura 4).<sup>86</sup> Através de alinhamento de sequência e comparação das estruturas cristalográficas, se verificou que a 3CLPro de SARS-CoV (PDB ID: 1UJ1) e SARS-CoV-2 (PDB ID: 6LU7) compartilham 96% de homologia estrutural.<sup>87-89</sup> O monômero da 3CLpro possui três domínios: a) domínio I (resíduos 8-101); b) domínio II (resíduos 102-184), ambos com estrutura antiparalela do barril- $\beta$  e; c) domínio III (resíduos 201-303) contendo cinco hélices  $\alpha$  dispostas em um aglomerado globular amplamente antiparalelo e um loop longo (resíduos 185-200) que conecta os domínios II e III. O sítio ativo do 3CLpro está localizado em uma fenda entre os domínios I e II e possui uma díade catalítica representada pelos resíduos Cys145 e His41 (Figura 4)<sup>85,86</sup>

#### 4.3.4. Inibidores de 3CLpro: lopinavir/ritonavir

Kaletra<sup>®</sup> é uma associação entre dois fármacos (lopinavir e ritonavir, Figura 5) da classe dos inibidores de aspartil-proteases do vírus da



**Figura 4.** Co-cristal da 3CLPro (código PDB: 6LU7) da SARS-CoV-2 com o inibidor alfa-cetamida, demonstrando interações do tipo ligações de hidrogênio (pontilhado) com PHE140, HIS164, GLU166, HIS163 e GLY143. Além de interações hidrofóbicas fracas e ligação covalente com CIS145 da díade catalítica

imunodeficiência adquirida (HIV), comercializado para o tratamento de pacientes adultos e crianças portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA ou AIDS). A protease aspártica do HIV cliva os polipeptídeos virais em proteínas funcionais essenciais para o ciclo de vida viral. Inibição da sua ação protease produz vírus imaturos e não infecciosos, impedindo assim, a infecção de novas células.<sup>90-93</sup>

Com a descoberta do SARS-CoV-2 e a descrição de alta identidade na sequência primária da 3CLpro de SARS-CoV e SARS-CoV-2, a combinação ritonavir/lopinavir foi testado quanto a sua capacidade de inibir a 3CLpro do SARS-CoV-2.<sup>94</sup> A partir destes estudos foi demonstrado que apenas o lopinavir inibiu a replicação *in vitro* de SARS-CoV-2 em concentrações inferiores a 100  $\mu\text{M}$ . Os efeitos analisados foram: efeitos citopáticos, redução do vírus e redução do RNA viral. Nestes parâmetros o lopinavir apresentou valores de  $\text{EC}_{50}$  de 25  $\mu\text{M}$ , 26,63  $\mu\text{M}$  e 26,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Enquanto o ritonavir apresentou  $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$  para todos os parâmetros analisados.<sup>95</sup> Estes dados revelaram que inibidores da 3CLpro contribuem para a inibição da replicação viral, tornando esta enzima um alvo atraente para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos para a COVID-19. No entanto, a confirmação do potencial antiviral de inibidores da 3CLpro em modelos *in vivo* é condição *sine qua non* para prova de conceito e estabelecimento da eficácia antiviral. Até o momento, estudos clínicos com ritonavir/lopinavir não se mostraram promissores. Um estudo feito em pacientes hospitalizados com pneumonia severa recebendo ritonavir/lopinavir (400 mg e 100 mg, respectivamente) duas vezes por dia durante 14 dias, e um grupo controle submetido a terapia padrão do hospital

levou a conclusão de que não houve melhora clínica significativa; a mortalidade após 28 dias foi semelhante nos dois grupos (19,2% lopinavir/ritonavir vs. 25,0% tratamento padrão) e as taxas de RNA viral detectável se mostrou semelhante em vários momentos.<sup>96</sup>

Impulsionados pelos dados promissores *in vitro*, outros inibidores de HIV-proteases, capazes de inibir também a 3CLpro de coronavírus estão sendo estudados como opção de reposicionamento para o tratamento da COVID-19, a exemplo do ledipasvir e velpatasvir (Figura 6).<sup>97</sup>

#### 4.4. Protease viral do tipo papaína (PLpro)

A PLpro, é uma protease do tipo papaína, que atua conjuntamente com a 3CLpro na clivagem dos polipeptídeos pp1a e pp1ab, codificando até 16 proteínas não estruturais. As proteases do tipo papaína clivam as nsp1-3.<sup>98</sup> Estudos anteriores de caracterização *in vitro* das atividades enzimáticas da PLpros do SARS-CoV e MERS-CoV indicaram que, além do seu papel na replicação viral, tais proteases também atuam suprimindo a resposta imune inata do hospedeiro, através da reversão da modificação pós-traducional de proteínas por ubiquitina (Ub) e produto genético estimulado por interferon 15 (ISG15).<sup>99, 100</sup> A ubiquitina (Ub) é uma proteína altamente conservada de 76 resíduos de aminoácidos, que forma um sistema com o proteassoma, chamado ubiquitina-proteassoma (UPS).<sup>101</sup> As enzimas chamadas ubiquitina ligases, ligam a ubiquitina à proteína alvo, e essa adição serve como um marcador de destruição altamente específico. Estas proteínas ubiquitinadas são levadas para o proteassoma para degradação. O ISG15 é o

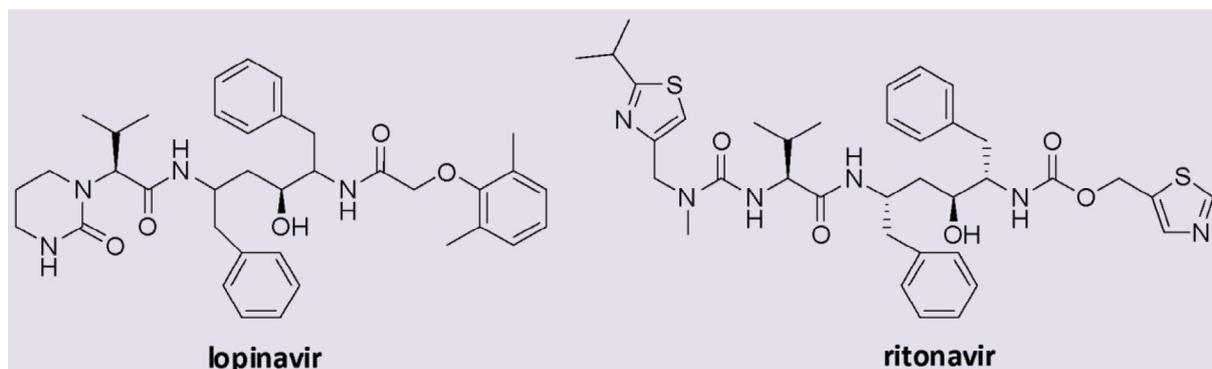
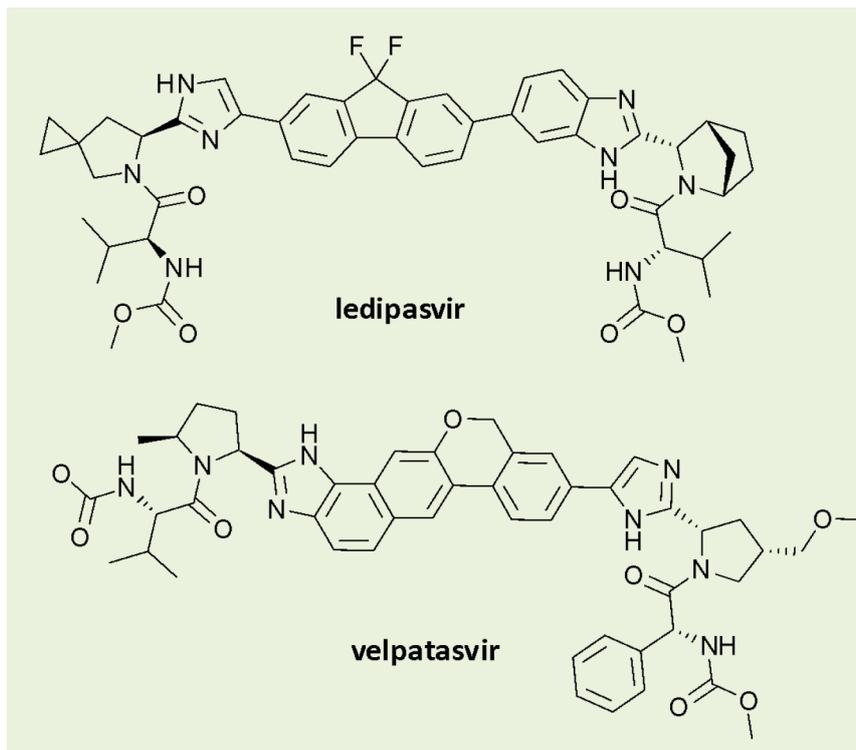


Figura 5. Estruturas químicas lopinavir e ritonavir



**Figura 6.** Estruturas químicas de inibidores de proteases: ledipasvir e velpatasvir

produto de um gene estimulado por interferons (IFN) do tipo I, capaz de se ligar a proteínas alvo regulando a sua função, um processo denominado ISGelação.<sup>102, 103</sup>

Tanto a ubiquitina quanto o ISG15 são covalentemente ligados às proteínas alvo por meio da formação de uma ligação isopeptídica entre o terminal C e o grupo ε-amino da cadeia lateral da lisina em uma proteína alvo. Esse processo onde enzimas fazem a remoção de UB e de ISG15 agem como forma de regulação da degradação proteica.<sup>98</sup>

Estudos demonstram que PLpro interfere na via de interferon a partir do bloqueio nas vias sinalização que ativam o fator de transcrição IRF-3 e NF-κB responsáveis por coordenar a expressão de interferons do tipo I (IFN-β e IFN-α).<sup>104,105</sup> Esses interferons induzem a ativação dos fatores de transição STAT, resultando na expressão de ISGs e estabelecimento de um estado antiviral na célula.<sup>98</sup> Por outro lado, Frieman e colaboradores demonstram que PLpro estabiliza o inibidor de NF-κB, IκBα e, assim, bloqueia a ativação da via de sinalização de NF-κB, responsável pela ativação das respostas inflamatória.<sup>106</sup> Posteriormente, foi demonstrado que a PLPro pode também bloquear a ativação de NF-KB por TNFα.<sup>107</sup>

#### 4.4.1. Inibidores de PLpro: dissulfiram

O dissulfiram (Figura 7) é um medicamento aprovado pela FDA em 1951 utilizado para o tratamento do alcoolismo.<sup>108</sup>. Estudos realizados propõem a ação do dissulfiram como inibidor da PLpro do SARS- COV e MERS-CoV. Como previamente mencionado, as PLpro são cisteinil proteases que utilizam o grupo tiol presente na estrutura do aminoácido cisteína como nucleófilo para atacar o grupo carbonila da ligação peptídica clivável.<sup>108</sup> O dissulfiram é um dissulfeto orgânico, que pode modificar covalentemente os resíduos de cisteína podendo, desta forma, promover a inibição da atividade catalítica da PLpro.<sup>109</sup> Outro mecanismo de inibição atribuído ao dissulfiram é sua capacidade de atuar como “ejetor de Zn<sup>+2</sup>”.<sup>110</sup> A PLpro possui quatro cisteínas ligadas a um íon de zinco (Figura 8). Portanto, o sequestro do zinco por parte do dissulfiram levaria a desestabilização da proteína e a perda de sua conformação bioativa e, conseqüentemente, perda de função.<sup>109</sup> Até o momento, não há dados *in vitro* que comprovem a diminuição da replicação viral pelo dissulfiram e tão pouco estudos clínicos em andamento.

**4.5. RNA-polimerase dependente-RNA (RpRd)**

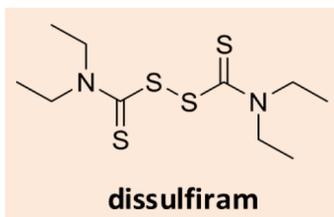
do material genético de RNA de vírus ocorra de forma eficaz.

4.5.1. Função biológica

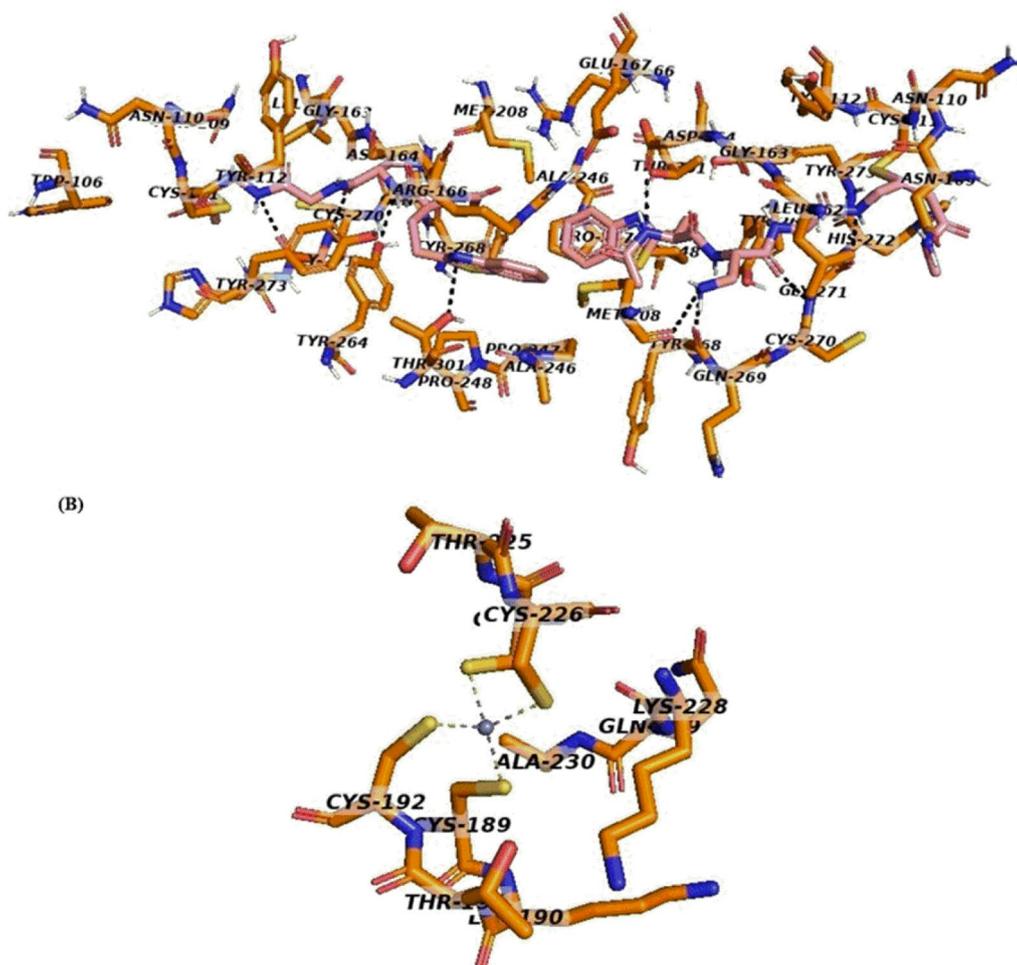
A RNA polimerase dependente de RNA consiste em uma enzima replicase, que catalisa a síntese de uma nova molécula de RNA complementar, utilizando como molde o RNA genômico viral. Sua principal função é assegurar que a replicação

4.5.2. Contribuição fisiopatológica na COVID-19

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA fita simples polaridade positiva (GRUPO IV) - de acordo com a classificação de David Baltimore. Desta forma, após os processos de adesão, penetração



**Figura 7.** Estrutura química do dissulfiram



**Figura 8.** (A) Co-cristal da PLpro de SARS-CoV-2 (código PDB: 6WUU) com o inibidor VIR250, demonstrando ligações de hidrogênio (pontilhado) com os resíduos ASP 164, Gly 271, TYR 268 e 264, GLY 271 (B) Representação do sítio alostérico da PLpro com os resíduos de aminoácidos CIS 192, CIS 226, CIS 189 e CIS 224 coordenados com o átomo de zinco

e desnudamento viral (Figura 1), o genoma viral é utilizado como RNAm para codificação ribossomal de poliproteínas virais, que serão clivadas por proteases para produção de proteínas não estruturais - como descrito anteriormente. Posteriormente, RNA subgenômicos são sintetizados, para seguir a produção de novos RNAs genômicos e proteínas estruturais destinadas à montagem de novos vírions. O processo de transcrição/replicação viral é mediado por um complexo replicase, formado por subunidades de proteínas não estruturais (nsp7-nsp12-nsp8), destacando-se a RNA-polimerase dependente-RNA (RdRp ou nsp12). Estudos sugerem que o complexo mínimo de replicação necessita da presença de nsp7-nsp8 para favorecer a processabilidade da RdRp, tendo em vista que a mesma não possui elevada capacidade de polimerização do RNA individualmente.<sup>111,112</sup> Portanto, a RNA-polimerase dependente-RNA consiste em um alvo promissor para fármacos antivirais pelo fato de ser uma proteína exclusivamente viral, que pode ter sua atividade interrompida e que possui alto grau de conservação estrutural em relação aos outros coronavírus. Essa conservação estrutural favorece a possibilidade de reposicionamento de fármacos já descritos como inibidores de RNA-polimerases, utilizados no tratamento terapêutico de outros surtos virais.<sup>112,21</sup>

#### 4.5.3. Dados estruturais e homologia

A RNA polimerase dependente de RNA, contém um domínio RdRp “*hand right*” (resíduos S367-F920) composto de três subdomínios denominados: *fingers* (resíduos L366-A581 e K621-G679), *palm* (resíduos T582-P620 e T680-Q815) e *thumb* (resíduos H816-E920); além de um domínio de extensão N-terminal exclusivo de nidovírus (resíduos D60-R249), que adota uma arquitetura nidovírus RdRp associada a nucleotidiltransferase nidovírus (NiRAN). O domínio de polimerase e o domínio NiRAN são conectados por um domínio de interface (resíduos A250-R36) inseridos no sulco fixado pelo domínio NiRAN e pelo subdomínio da *palm* no domínio RdRp. As proteínas nsp7-nsp8 mostra uma estrutura conservada semelhante as proteínas nsp de SARS-CoV.

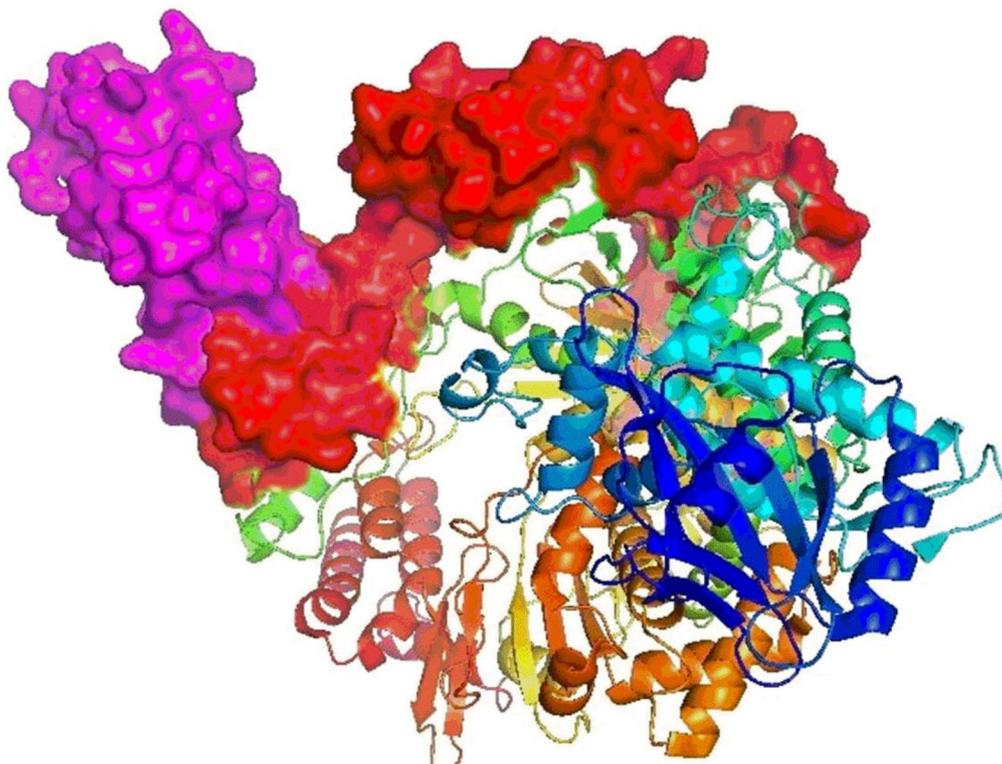
A arquitetura geral do complexo nsp12-nsp7-nsp8 de SARS-CoV-2 é semelhante à do SARS-CoV. No entanto, existem características-chave que

distinguem os dois. A nsp12 de SARS-CoV-2 não teve todos seus resíduos resolvidos, pois S1-D3 e G897-D901 não foram observados nas técnicas de elucidação utilizadas, assim como os primeiros 116 resíduos de SARS-CoV. A porção do domínio NiRAN (resíduos 4 a 28 e 51 a 249) compreende oito hélices com cinco fios de folhas na região N terminal.

Na estrutura também foram resolvidos resíduos A4-R118, que constituem um bloco estrutural com cinco fitas  $\beta$  anti-paralelas e duas  $\alpha$ -hélices (Figura 9). Resíduos N215-D218 formam uma fita  $\beta$  em SARS-CoV-2, fazendo contato com a cadeia que inclui resíduos V96-A100, contribuindo assim para a estabilização de sua conformação, enquanto em SARS-CoV são menos ordenados. Como resultado, essas quatro fitas- $\beta$  formam uma arquitetura semi-barril/semi- $\beta$ -barril. Com a resolução de resíduos N-terminais, também pode-se identificar uma estrutura N-terminal do tipo  $\beta$ -*hairpin* (D29 à K50), que se insere na ranhura fixada pelo domínio NiRAN e pelo subdomínio da *palm* no domínio RdRp e forma um conjunto de contatos entre folhas- $\beta$  próximas para estabilizar a estrutura geral. Outro ponto a ser observado é que C301-C306 e C487-C645 formam pontes dissulfeto na ausência de DTT (Dataset-1). Como sempre, na presença de DTT (Dataset-2), íons de zinco estão presentes no mesmo local que observado para o SARS-CoV. O sítio ativo do domínio RdRp de SARS-CoV-2 é formado por subunidades estruturais conservadas em polimerase A-G nos domínios *palm* e *hand* e configurados como em outras RNA polimerases. A subunidade A é composta por resíduos 611-TPHLMGWDPKCDRAM-626 contendo o clássico resíduo D618 que interage com cátions bivalentes, e subunidade C (resíduos 753-FSMMILSDDAVVCFN-767) que é conservado na maioria das polimerases virais, contendo os resíduos catalíticos 759-SDD-761 entre as duas fitas- $\beta$ . Esses resíduos catalíticos também são conservados na maioria das RNA polimerases dependentes de RNA virais.<sup>38</sup>

#### 4.5.4. Inibidores da RNA polimerase dependente de RNA

Os inibidores da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) consistem em um conjunto de fármacos pertencentes à classe farmacológica conhecida por análogos de nucleosídeos, que após fosforilação são transformados em nucleotídeos



**Figura 9.** Complexo da RNA polimerase dependente de RNA do SARS-CoV-2 com nsp7 e nsp8

e incorporados à sequência do RNA viral, como “falsos nucleotídeos”. A ausência de hidroxila na posição 3’ do anel de desoxirribose impede o alongamento da cadeia de RNA, implicando na interrupção da replicação do material genético.<sup>113</sup>

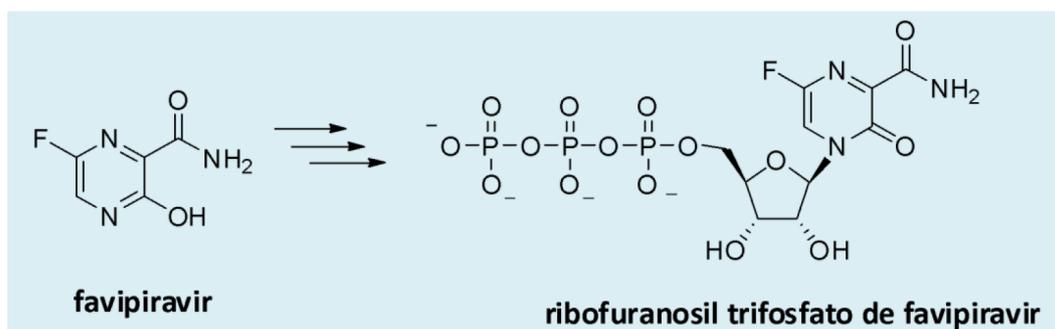
#### 4.5.4.1. Favipiravir

O favipiravir (Figura 10) é um análogo da purina o qual inibe o RdRp competitivamente. Trata-se de um pró-fármaco que sofre múltiplas etapas de bioativação, por enzimas celulares, até sua conversão ao ribofuranosil trifosfato de favipiravir

(Figura 10). Em modelos *in vitro*, foi demonstrada sua atividade contra o SARS-CoV-2 com valor de  $IC_{50} = 61,88 \mu M$ . Em ensaio clínico não randomizado com apenas 80 pacientes chineses acometidos pela COVID-19, o favipiravir demonstrou-se capaz de reduzir a depuração viral do SARS-CoV-2.<sup>114,115</sup>

#### 4.5.4.2. Remdesivir

Descoberto a partir de estudos realizados com uma vasta quimioteca de análogos nucleosídicos, por meio de colaborações entre Gilead Sciences, Centros de Controle e Prevenção de Doenças



**Figura 10.** Estrutura química do favipiravir e seu metabólito ativo ribofuranosil trifosfato de favipiravir

(CDC) e Instituto de Pesquisa Médica do Exército para Doenças Infecciosas (USAMRIID), dos Estados Unidos da América, o remdesivir (Figura 11), possui um grupo ariloxi-fosforamidato ligado ao carbono 5' do anel de ribose, que confere maior permeabilidade através de membranas celulares. Após permeação o remdesivir é substrato de dois processos hidrolíticos no meio intracelular, levando a formação do nucleosídeo-monofosfatado (denominado remdesivir monofosfato, RMP), que rapidamente é trifosfatado por quinases celulares, originando o trifosfato de remdesivir (RTP), que funciona como “falso” nucleotídeo de adenosina (Figura 11). Este metabólito ativo (RTP) é utilizado pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) como substrato. Sua incorporação na cadeia de RNA em construção leva à efeitos estéricos desfavoráveis, retardando o término da cadeia de RNA e, conseqüentemente, prejudicando a replicação viral.<sup>116</sup>

Desde sua descoberta o remdesivir (GS-5734) foi estudado como antiviral contra diferentes infecções promovidas por RNA-vírus, a exemplo do vírus Ebola, MERS-CoV, Hepatite C e SARS-CoV. Vários estudos *in vitro* e pré-clínicos em animais tem demonstrado seu amplo espectro de ação antiviral, incluindo contra infecções promovidas por SARS-CoV-2.<sup>71,95,117-119</sup>

Estes achados promissores levaram o remdesivir a estudos clínicos com pacientes hospitalizados com casos graves de COVID-19. Os resultados já divulgados indicaram melhora clínica em 36 dos 53 pacientes (68%) tratados.<sup>120</sup> Apesar de promissor, o estabelecimento da eficácia e segurança do remdesivir em pacientes com COVID-19 carece de estudos adicionais, pautados em ensaios clínicos randomizados, duplo-cego, que se encontram em andamento.

Dentre os membros da classe dos inibidores de RdRp, o remdesivir é considerado o mais promissor, embora não tenha sido previamente comercializado como fármaco.<sup>71</sup> Mais recente-

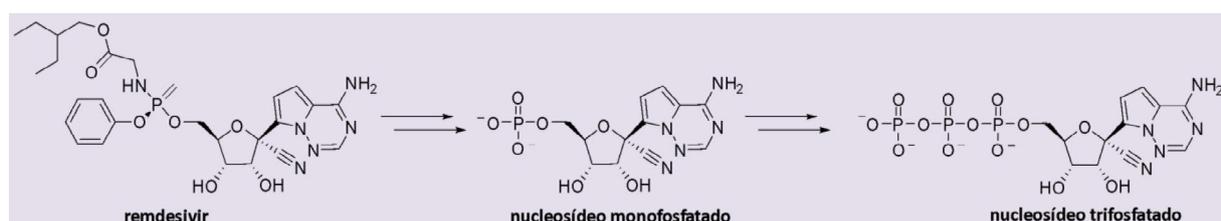
mente, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) autorizou o uso e a venda do antiviral remdesivir para o tratamento de caso graves da COVID-19 em países da comunidade Europeia.

Além do favipiravir e remdesivir, outros fármacos análogos nucleosídicos tais como a ribavirina e o galidesivir (Figura 12) inibem eficientemente a replicação SARS-CoV-2 em ensaios celulares.<sup>10</sup>

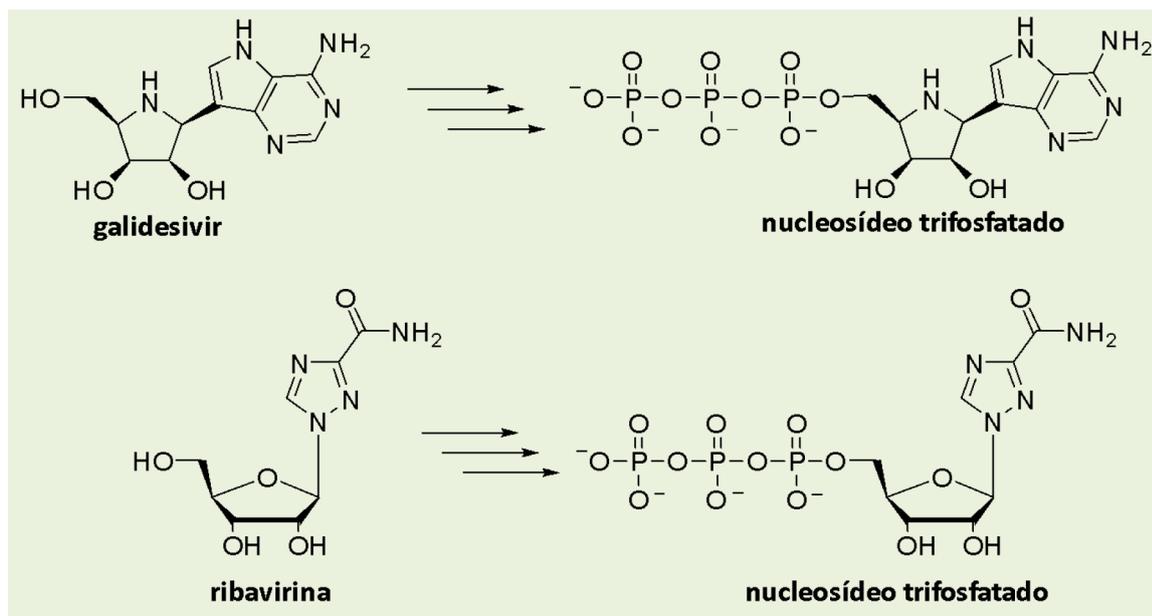
## 4.6. Moduladores do processo de endocitose

### 4.6.1. Função biológica

Os endossomas são compartimentos membranosos formados a partir do processo de endocitose, cuja principal função é a formação dos lisossomos – organelas responsáveis pela digestão intracelular. Os lisossomos são vesículas delimitadas por uma membrana celular, que recebem cargas de diversos processos incluindo através da via endocítica. O interior dessas vesículas é composto por diversas enzimas degradativas (proteases) para todos os tipos de macromoléculas, cuja função hidrolítica é otimizada em pH ácido. A acidez dos lisossomas é mantida pela atividade da bomba de prótons V-ATPase. Após a endocitose, cargas internalizadas entram inicialmente no endossomo inicial, onde são classificadas para seguir dois destinos: são recuperadas para reciclagem na membrana plasmática, ou são entregues ao endossomo tardio para posterior formação do lisossomo. Outro papel importante dos endossomos é o endereçamento das partículas endocitadas para locais específicos da célula. Eles são relevantes ao processo de transmissão sináptica, uma vez que após a liberação de neurotransmissores, as vesículas sinápticas devem ser recuperadas envolvendo processo endocítico rápido com formação de endossomos de reciclagem. Portanto, as principais funções biológicas da via endocítica



**Figura 11.** Estrutura química de inibidores de RdRp: Pró-fármaco remdesivir e seus metabólitos ativos remdesivir monofosfato e trifosfato



**Figura 12.** Estrutura química galidesivir e ribavirina e seus metabólitos ativos trifosfatados

são a internalização de proteínas de carga com o objetivo de recuperação e reciclagem. Tais funções são conhecidas por ter papel chave na fisiopatologia de doenças humanas importantes. Um dos reguladores conhecidos da endocitose é a cinase associada ao adaptador AP2 (AAK1), que como explicado anteriormente age ativamente na endocitose mediada por clatrina.<sup>33</sup>

#### 4.6.2. Contribuição fisiopatológica na COVID-19

O papel da fagocitose nas infecções por CoVs vem sendo estudado desde o surto de SARS em 2002-2003. Acredita-se que os CoVs entrem nas células hospedeiras através de duas rotas: a via endocítica e via de fusão membranar. Entre elas, o caminho endocítico é considerado particularmente importante e tem sido extensamente estudado.<sup>32</sup> Para iniciar sua entrada via endocítica, os CoVs dependem da AAK1 – uma serina-treonina cinase celular que funciona como um regulador chave das proteínas adaptadoras do hospedeiro associadas à clatrina, regulando o tráfego intracelular de vários vírus de RNA, haja vista seu papel central na endocitose mediada por receptor, incluindo a ligação direta à clatrina e a fosforilação específica da subunidade  $\mu 2$  da proteína adaptadora 2 (AP-2). A inibição da AAK1 pode, por sua vez, interromper a entrada do vírus nas células e também inibir a montagem de partículas virais.<sup>121</sup>

Quando internalizadas, independente da via, as vesículas tornam-se endossomos precoces que serão a chave para infecção viral. A evolução para endossomo tardio e posteriormente em lisossomo são essenciais para infecção. Porém, para que haja esses processos é requerida a acidificação interna do endossomo via V-ATPase – uma bomba de prótons, dependente de ATP, altamente expressa em diversos tecidos e encontrada principalmente em mitocôndrias. Uma vez acidificado o endossomo ativa proteases lisossomais (a exemplo das catepsinas L e B) que realizam clivagem proteolítica da proteína S, permitindo que haja sua fusão com a membrana do endossoma, favorecendo a etapa de desnudamento, ou seja, permitindo a liberação do conteúdo interno viral no citoplasma da célula hospedeira, que será procedida pela etapa de replicação viral.<sup>33</sup> A inibição da V-ATPase como estratégia terapêutica é inviável, devido aos inúmeros efeitos adversos decorrentes de tal inibição. Todavia, outras alternativas para modulação do processo endossomal existem, a exemplo do uso de moduladores do pH endossomal (tais como cloroquina e hidroxicloroquina) e de inibidores da cinase AAK1.

#### 4.6.3. Cloroquina e análogos

A cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ) são fármacos de natureza básica, originalmente descobertos como antimaláricos. São capazes

de permear a membrana dos endossomas e lisossomas. No interior destas organelas sofrem reação ácido-base, que resulta na protonação da CQ e HCQ, diminuindo sua lipofilicidade e impedindo a permeação para o meio extracelular (com conseqüente acúmulo no meio intracelular). Como resultado dessa reação ácido-base ocorre o aumento do pH endossomal e bloqueio da atividade hidrolítica de proteases, que levariam a degradação do endossoma e liberação de seu conteúdo no citoplasma da célula.<sup>121</sup> Desta forma, o processo de penetração do SARS-CoV-2 na célula hospedeira, mediado pela via endocítica, pode ser significativamente modulado pela ação da CQ e HCQ.

Após observação do efeito antiviral *in vitro*, o reposicionamento da CQ e a HCQ (Figura 13) para tratamento da COVID-19 foi proposto e estes fármacos foram estudados em múltiplos ensaios clínicos com pacientes hospitalizados com COVID-19.<sup>123,124</sup> Até o momento nenhum dos estudos realizados foi capaz de demonstrar a eficácia da CQ ou HCQ em humanos para o tratamento da COVID-19. A toxicidade associada a esta abordagem é ainda controversa.

#### 4.6.4. Baricitinibe e nintedanibe

Considerando o papel da AAK1 na penetração do SARS-CoV-2 mediada por endocitose dependente de clatrina, vários fármacos que exercem seus efeitos farmacológicos dependentes da inibição de cinases foram testados quanto sua capacidade de inibir a AAK1 e, posteriormente, quanto seu potencial antiviral<sup>118,125</sup>. Dentre eles, os resultados mais bem sucedidos foram encontrados para o baricitinibe e nintedanibe (Figura 14), sendo o primeiro aquele de maior potência inibitória frente a enzima AAK1. O baricitinibe

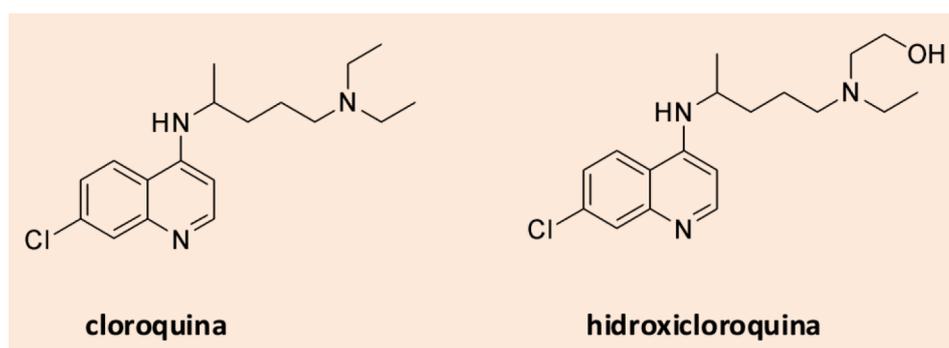
(Olumiant®), aprovado para o tratamento da artrite reumatoide, é um inibidor de Janus (JAK) cinase, especificamente das isoformas JAK1 e JAK2. Acredita-se que a conjugação de seu efeito antiviral, mediado pela inibição da AAK1, e anti-inflamatório, mediado pela inibição da JAK1 e JAK2, conferiria ao baricitinibe propriedades ideais para controlar a infecção viral e a inflamação crônica promovida pelo SARS-CoV-2.<sup>126,127</sup> Recentemente, os laboratórios Eli Lilly anunciaram o início de estudos clínicos de fase 3 com o baricitinibe, em pacientes hospitalizados com COVID-19.

#### 4.7. Receptor de Interleucina-6 (IL-6R)

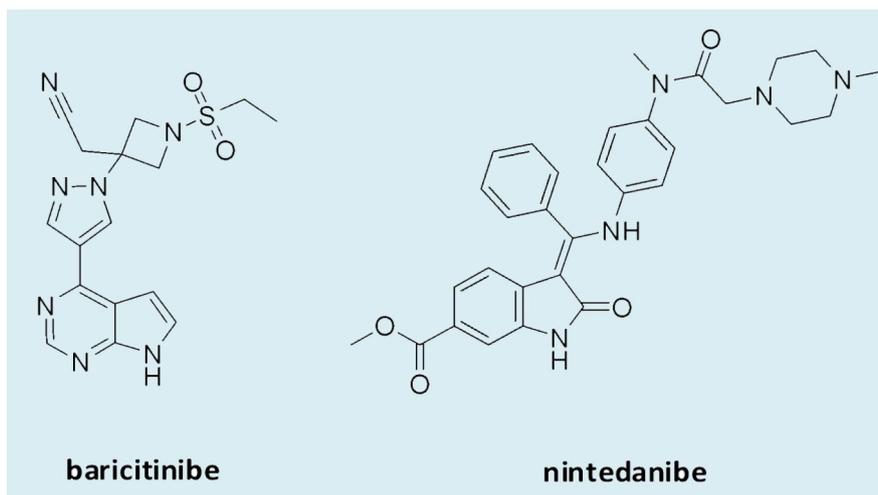
Estudossobreainfecção por SARS-CoV-2 sugerem que a resposta imune mediada por interferon gama (IFN $\gamma$ ) encontra-se desativada por proteínas estruturais do envelope viral (ex. proteína N). Em contrapartida, a produção de citocinas pró-inflamatórias encontra-se exacerbada resultando no fenômeno conhecido por “tempestade de citocinas”, comentado anteriormente. Dentre as citocinas mais prevalentes na COVID-19 está a interleucina 6 (IL-6), intimamente ligada a respostas inflamatórias e infecciosas. Ela exerce suas ações biológicas mediadas pela ativação dos receptores IL-6R, também conhecidos como CD126 ou gp80.<sup>128</sup>

##### 4.7.1. Função Biológica

A IL-6 é uma citocina polifuncional produzida por monócitos e macrófagos, células T e outras células não linfocíticas, (como os fibroblastos) no início da infecção viral, através da estimulação de receptores do tipo Toll (TLRs). Ela possui papel chave em infecções agudas.<sup>46,129</sup> Trata-se de uma proteína glicosilada de 21-28 kDa, que desempenha suas funções biológicas através da



**Figura 13.** Estrutura química da cloroquina (CLQ) e hidroxicloroquina (HCQ)



**Figura 14.** Estrutura química do nintedanibe e baricitinibe

interação com seus receptores de membrana (IL-6R) e receptores solúveis (sIL-6R) e posterior ativação do co-receptor gp130, presente na superfície de diversas células imunes, além de fibroblastos e pneumócitos alveolares.<sup>51</sup> A interação da IL-6 com IL-6R e sIL-6R promove dimerização da glicoproteína transmembranar co-receptora (gp130), levando a ativação de vias de transdução de sinais clássicas. Células que não expressam IL-6R em sua superfície podem ter a via de transdução de sinal ativadas via sIL-6R. A transdução de sinal culmina na ativação de JAK/STAT, ERK e PI3K.<sup>52,129</sup>

Entre suas principais funções, destaca-se a expansão e ativação de células T, linfócitos T citotóxicos (CTLs), células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além da regulação de citocinas pró-inflamatória de células T gerais e inibição da diferenciação em células T regulatórias (Treg). A IL-6 possui importante papel na ativação e produção de anticorpos, quando ativada na superfície de células B. Além disso, IL-6R e gp130 estão envolvidas em vias de ativação metabólicas, principalmente ativação da resposta hepática de fase aguda.<sup>51</sup> Resumindo, a interação IL-6 com IL-6R promove diferenciação e proliferação celular, regulação imunológica, ativação da resposta aguda nos hepatócitos, além de contribuir para o recrutamento de leucócitos para locais de infecção.<sup>129</sup>

#### 4.7.2. Contribuição fisiopatológica na COVID-19

A ativação imune é benéfica para o combate a infecção aguda, promovendo a eliminação

do patógeno e posterior restabelecimento da homeostase. Contudo, na COVID-19, a presença de IL-6 em grandes concentrações, em conjunto com a desativação da resposta imunológica via IFN $\gamma$ , leva à resposta ineficiente do combate a infecção viral e resulta em alta extensão de dano tecidual.<sup>129, 130</sup> A presença do IL-6R e co-receptor gp130 na superfície celular, e sIL-6R, direciona a extensão e ativação da resposta imune inata e humoral, pois a interação com seu substrato IL-6 tem a habilidade de ativar diferentes vias de sinalização intracelular com a finalidade principal de aumentar a expressão gênica através de fatores de transcrição STAT (do inglês *signal transducers and activators of transcription*), p65 e p50. Relata-se que a trans-sinalização via IL-6, causa um desequilíbrio na expressão gênica de citocinas, possivelmente pela remoção do supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3). Dessa forma, propõem-se que a intensa transdução de sinal mediada pelas vias JAK-MAPK pode ser a chave para “tempestade de citocinas”.<sup>131</sup>

Acredita-se que a sinalização celular exacerbada via ativação dos receptores IL-6/sIL-6R/gp130 pode ser a principal causa de exaustão linfocitária (linfopenia) e consequente produção de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, decorrentes de intensa expressão gênica, descrita anteriormente. Por conseguinte, ocorre a cronificação da resposta inflamatória aguda que resulta em lesão do epitélio pulmonar, comprometendo sua funcionalidade. Como citado anteriormente, soro de pacientes com manifestações clínicas graves da COVID-19 apresentam elevadas concentrações de proteína-

sérica-C e outras citocinas pró-inflamatórias. A IL-6 possui papel central na produção e regulação da proteína-sérica-C, um marcador inflamatório sintetizado pelo fígado e regulado principalmente por citocinas.<sup>42,129,132,133</sup>

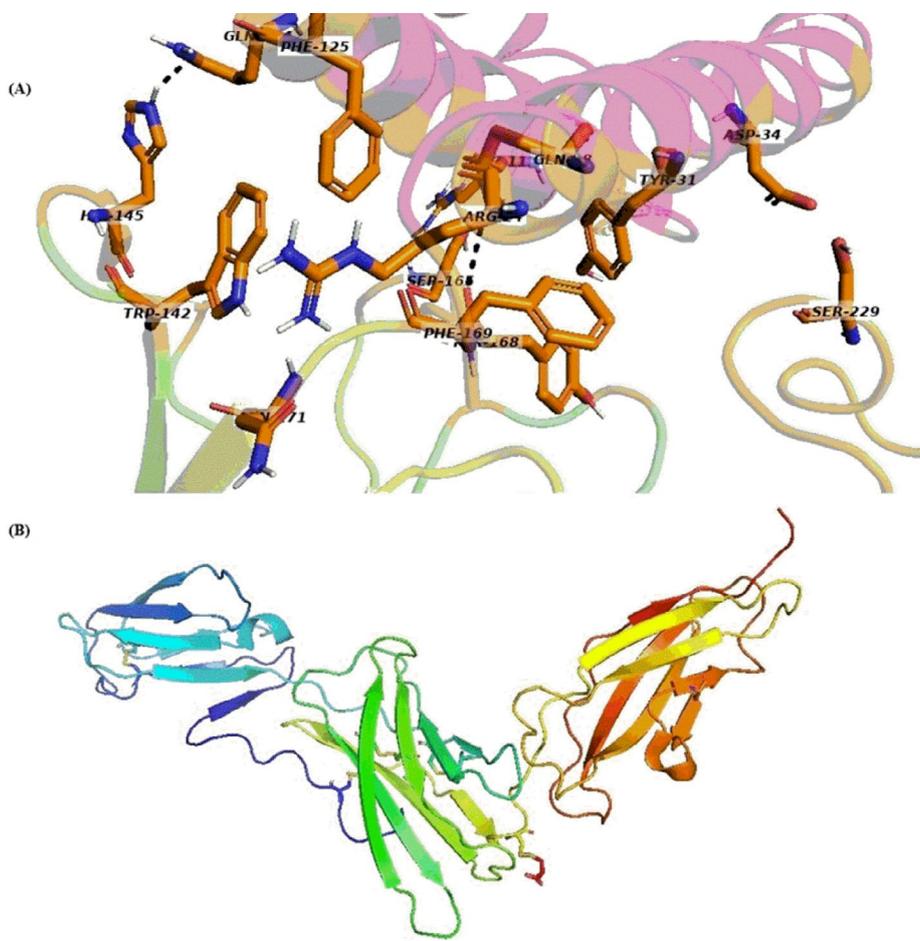
#### 4.7.3. Dados estruturais e Homologia

O receptor IL-6R (80kDa) compõe a família de receptores de citocinas tipo I. Possui três domínios: extracelular, transmembranar e citosólico. Acredita-se que apenas o domínio extracelular tenha papel na sinalização mediada pela ativação dos receptores IL-6R.<sup>128</sup> A região extracelular do receptor, é composta por três domínios. O domínio D1 (subunidade N-terminal) possui estrutura semelhante à imunoglobulina. Os domínios D2

e D3 são homólogos em relação à presença do módulo de ligação de citocinas (CBM) e consistem em duas fibronectinas tipo III. O domínio D2 (CBM) possui uma dobradiça rica em prolina e resíduos de cisteínas altamente conservados. O domínio D3 representa a subunidade C-terminal. IL-6 se liga à IL-6R com baixa afinidade, e após dimerização, o complexo IL-6/IL-6R interage com gp130 para induzir sinalização celular. Essa interação forma um complexo hexâmérico, formado por dois heterotrímeros de IL-6, IL-6R e gp130 (Figura 15).<sup>128, 134,135</sup>

#### 4.7.4. Bloqueadores dos receptores IL-6R/sIL-6R

Uma vez evidenciada a participação do complexo IL-6/IL-6R na fisiopatologia da COVID-19



**Figura 15. (A)** Representação do modo de interação da IL-6 e o sítio ativo do IL-6R humano (Código PDB: 1P9M), demonstrando ligações de hidrogênio (pontilhadas) com os aminoácidos HIS145, GLU124, TYR168 e GLU28, além de interações  $\pi$ -stacking entre TYR168, TYR31, TRP142 e PHE125. Ligações de hidrogênio mais distantes e por isso mais fracas entre ARG113, SER165, ASP34, SER229, ASN171 e ARG 24 são demonstradas.<sup>136</sup> **(B)** Representação da estrutura 3D do receptor IL-6R obtida por cristalografia de raios-X (código PDB:1N26)<sup>128</sup>

e sua contribuição na evolução da gravidade da doença, estratégias que bloqueiem a sinalização mediada pela IL-6 são consideradas opções importantes para a redução e contenção de danos imunopatológicos.<sup>52</sup> Com base nesta premissa, o reposicionamento do tocilizumab para o tratamento das complicações da COVID-19 vem sendo estudado. Trata-se do primeiro anticorpo monoclonal recombinante (subtipo IgG) humano, uma imunoglobulina G1 humanizada recombinante (IG1) que se liga especificamente aos receptores IL-6R e sIL-6R, antagonizando-os. Foi aprovado em 2010 para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e artrite idiopática juvenil sistêmica.<sup>52,137</sup> Com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do tocilizumab no tratamento da COVID-19, estudos clínicos encontram-se em andamento.<sup>138</sup> Um dos estudos com a participação de pacientes em estados críticos e graves, submetidos à terapia padrão de COVID-19 foi realizado com a administração de 4-8 mg. Kg<sup>-1</sup> por 13 dias. A conclusão do estudo demonstrou que o tocilizumab melhora efetivamente os sintomas clínicos da COVID-19, e auxiliou na redução de pacientes graves, indicando que o medicamento pode ser uma estratégia terapêutica promissora. Estudos mais conclusivos da utilização do tocilizumab de forma independente e em associação com outras

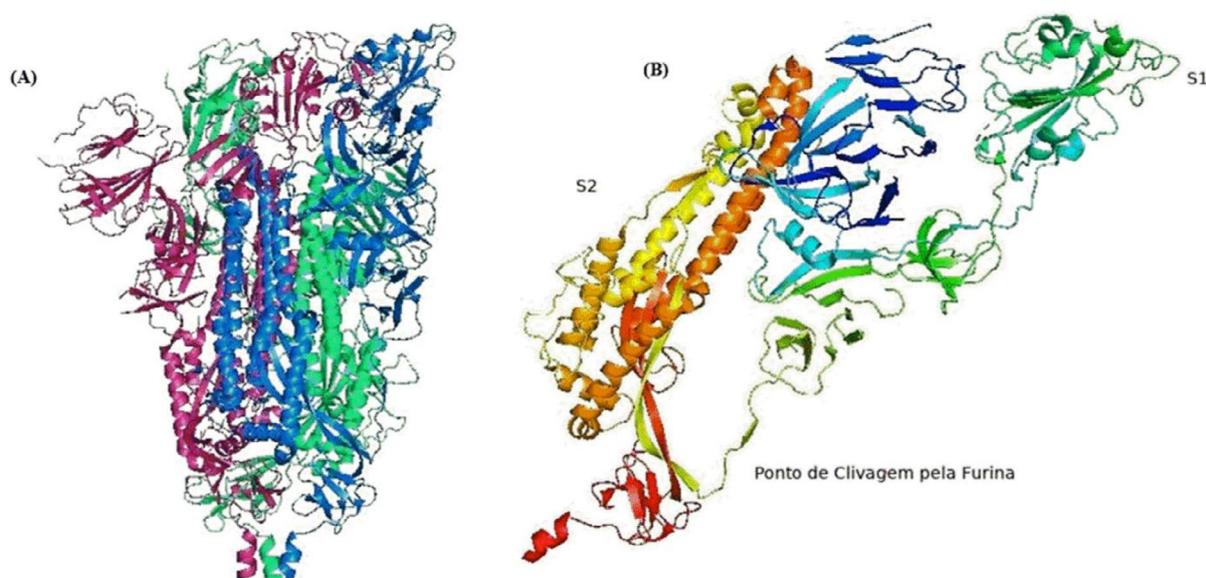
estratégias terapêuticas potenciais, que tenham maior número de pacientes e com metodologias mais assertivas, estão em andamento na China. (informação verificada até a data de apresentação desta revisão. Clinical Trials: NCT04310228, ChiCTR200002976, NCT04315298).<sup>138</sup>

#### 4.8. Glicoproteína S (Spike)

A glicoproteína S é uma proteína homotrimérica (Figura 16) ancorada no nucleocapsídeo viral composta por duas subunidades (S1 e S2) que tem função de reconhecimento e ancoramento da partícula viral na célula alvo.<sup>34</sup>

##### 4.8.1. Contribuição fisiopatológica

Durante a infecção viral, o trímero da proteína S (ou glicoproteína S) sofre clivagem proteolítica entre as subunidades ou segmentos S1 e S2. Enquanto a clivagem entre S1/S2 remove a restrição estrutural de S1 sobre S2 – permitindo a exposição do domínio RBD que interage diretamente no domínio da peptidase (DP) da ECA-2 – a clivagem no segmento S2 libera o peptídeo de fusão interno para inserção nas membranas alvo. Essa etapa auxilia o processo de fusão mediado pela protease de superfície celular TMPRSS2 (abundantes em



**Figura 16. (A)** Demonstrando o homotrímero da glicoproteína Spike de SARS-CoV-2 em sua conformação aberta obtida do cristal (código PDB: 6VYB); **(B)** Demonstrando monômero inativo da glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 com as subunidades S1 (domínio de interação com ECA2) e S2 (detentora do núcleo de fusão) ligadas pelo sítio de clivagem pela furina

células do tecido pulmonar) e por proteases lisossômicas como as catepsinas.

Por possuir diversas *N*-glicanos, a estrutura quaternária da proteína S dispõe de grande liberdade conformacional fazendo com que seja reconhecida por diversas proteases do hospedeiro. Acredita-se que tal característica possa ser explorada para produção de anticorpos neutralizadores.<sup>30,139</sup>

#### 4.8.2. Homologia com SARS-CoV

SARS-CoV e SARS-CoV-2 compartilham 89,8% de homologia na sequência das subunidades S2 de suas glicoproteínas S e ambas as subunidades S1 utilizam a ECA-2 como receptor para infectar células humanas. A afinidade da ECA-2 pelo RBD da subunidade S1 de SARS-CoV-2 é de 10 a 20 vezes maior do que a de SARS-CoV, fator que pode contribuir para o maior infectividade, transmissibilidade e virulência do SARS-CoV-2 em comparação com SARS-CoV. Ao contrário de outros  $\beta$ -coronavírus, a glicoproteína S de SARS-CoV-2 abriga um sítio entre as subunidades S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>; sítio esse reconhecido pela furinas. Este dado sugere que a glicoproteína S pode possuir algumas propriedades infecciosas inéditas e a torna elegível como alvo para o desenvolvimento de vacinas.<sup>140</sup>

#### 4.8.3. Vacinas baseadas na glicoproteína S

Tem sido demonstrado que a glicoproteína S desempenha um papel fundamental na indução de anticorpos neutralizantes e na resposta de células T, além de contribuir para a imunidade de proteção durante a infecção pelo SARS-Co-2. Desta forma, a glicoproteína S de SARS-CoV-2 é considerada alvo relevante para o desenvolvimento de vacinas. Tais vacinas são comumente planejadas usando integralmente a glicoproteína S ou apenas o fragmento RBD – neste último caso permitindo a obtenção de vacinas sintéticas.<sup>28,141-144</sup>

## 5. Considerações Finais

A COVID-19 é um dos maiores problemas de saúde pública dos últimos séculos, com nefasto impacto socioeconômico. Trata-se de uma necessidade médica não atendida, portanto, todos os esforços voltados ao desenvolvimento de novas vacinas ou de fármacos para seu tratamento são prioritários. A abordagem de

reposicionamento de fármacos – que se baseia de forma sumária no princípio de estudar a aplicação de fármacos ou medicamentos já conhecidos para o tratamento de doenças raras, negligenciadas ou com pouca ou nenhuma opção terapêutica – vem sendo bastante explorada. Entretanto, nenhum achado incontestemente emergiu dos diferentes estudos clínicos já realizados. Até o momento, o escrutínio dessa abordagem deixa clara a falta de evidências científicas robustas que comprovem sua eficácia e segurança nos diferentes estágios da doença.

À medida que se revelam as características do processo fisiopatológico, que se compreendem o processo de replicação viral e os alvos moleculares envolvidos em cada etapa, surgem possibilidades reais de intervenção terapêutica, permitindo que milhares de compostos sejam estudados quanto a sua capacidade de modular os alvos identificados, controlando o processo de infecção viral. As proteases (virais ou humanas), polimerases e cinases são certamente os alvos mais relevantes e validados como estratégia antiviral, a partir de ensaios de inibição enzimática e inibição da replicação viral em modelos fenotípicos.

A partir da estratégia de reposicionamento, fármacos previamente comercializados para o tratamento de doenças diversas foram mostrados capazes de bloquear ou modular o processo de replicação viral *in vitro*, mas desapontaram quanto à sua eficácia antiviral *in vivo*. Fato que, ao menos em parte, pode ser explicado pelas múltiplas vias de ativação que levam às etapas de adesão e penetração do vírus na célula. Portanto, não surpreende que os resultados mais promissores decorram do uso de inibidores da RNA-polimerase (a exemplo do remdesivir) e não dos inibidores de fusão ou da via endocítica ou mesmo da adesão do vírus à célula hospedeira.

Quiçá estratégias que contemplem o bloqueio simultâneo de mais de um alvo molecular possam reverter este cenário e contribuir para o aumento da eficácia antiviral *in vivo*.

## Referências

- Bogoch, I.; Watts, A.; Thomas-Bachli, A.; Huber, C.; Kraemer, M.; Khan, K. Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan, China: Potential for International Spread Via Commercial Air Travel. *Journal of travel medicine* **2020**, *27*, 1. [CrossRef] [PubMed]

- <sup>2</sup> Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 727. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>3</sup> Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Advances in Virus Research* **2018**, *100*, 188. [CrossRef]
- <sup>4</sup> Cheng, V. C. C.; Lau, S. K. P.; Woo, P. C. Y.; Yuen, K. Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus as an Agent of Emerging and Reemerging Infection. *Clinical Microbiology Reviews* **2007**, *20*, 694. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>5</sup> World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/21-september-2017-mers-uae/en/>> Acesso em: 29 Junho 2020.
- <sup>6</sup> Ge, X.-Y.; Li, J.-L.; Yang, X.-L.; Chmura, A. A.; Zhu, G.; Epstein, J. H.; Mazet, J. K.; Hu, B.; Zhang, W.; Peng, C.; Zhang, Y.-J.; Luo, C.-M.; Tan, B.; Wang, N.; Zhu, Y.; Cramer, G.; Zhang, S.-Y.; Wang, L.-F.; Daszak, P.; Shi, Z.-L. Isolation and Characterization of a Bat SARS-like Coronavirus That Uses the ACE2 Receptor. *Nature* **2013**, *503*, 538. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>7</sup> Drosten, C.; Günther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H.-R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A. M.; Berger, A.; Burguière, A.-M.; Cinatl, J.; Eickmann, M.; Escriou, N.; Grywna, K.; Kramme, S.; Manuguerra, J.-C.; Müller, S.; Rickerts, V.; Stürmer, M.; Vieth, S.; Klenk, H.-D.; Osterhaus, A. D. M. E.; Schmitz, H.; Doerr, H. W. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine* **2003**, *348*, 1976. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>8</sup> Saqib, M.; Sieberg, A.; Hussain, M. H.; Mansoor, M. K.; Zohaib, A.; Lattwein, E.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Corman, V. M. Serologic Evidence for MERS-CoV Infection in Dromedary Camels, Punjab, Pakistan, 2012–2015. *Emerging Infectious Diseases* **2017**, *23*, 550. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>9</sup> Reusken, C. B.; Haagmans, B. L.; Müller, M. A.; Gutierrez, C.; Godeke, G.-J.; Meyer, B.; Muth, D.; Raj, V. S.; Vries, L. S.-D.; Corman, V. M.; Drexler, J.-F.; Smits, S. L.; Tahir, Y. E. E.; Sousa, R. D.; Beek, J. van; Nowotny, N.; Maanen, K. van; Hidalgo-Hermoso, E.; Bosch, B.-J.; Rottier, P.; Osterhaus, A.; Gortázar-Schmidt, C.; Drosten, C.; Koopmans, M. P. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Neutralising Serum Antibodies in Dromedary Camels: A Comparative Serological Study. *The Lancet Infectious Diseases* **2013**, *13*, 859. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>10</sup> Van der Hoek, L. Human Coronaviruses: What Do They Cause? *Antiviral Therapy (Lond.)* **2007**, *12*, 651. [PubMed]
- <sup>11</sup> Andersen, K. G.; Rambaut, A.; Lipkin, W. I.; Holmes, E. C.; Garry, R. F. The Proximal Origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* **2020**, *26*, 450 [CrossRef] [PubMed]
- <sup>12</sup> Tang, X.; Wu, C.; Li, X.; Song, Y.; Yao, X.; Wu, X.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wang, Y.; Qian, Z.; Cui, J.; Lu, J. On the Origin and Continuing Evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review* **2020**, *7*, 1012. [CrossRef]
- <sup>13</sup> Zhang, T.; Wu, Q.; Zhang, Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. *Current Biology* **2020**, *30*, 1346. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>14</sup> Lam, T. T.; Jia, N.; Zhang, Y. W.; Shum, M. H.; Jiang, J. F.; Zhu, H. C.; Tong, Y. G.; Shi, Y. X.; Ni, X. B.; Liao, Y. S.; Li, W. J.; Jiang, B. G.; Wei, W.; Yuan, T. T.; Zheng, K.; Cui, X. M.; Li, J.; Pei, G. Q.; Qiang, X.; Cheung, W. Y.; Li, F. L.; Sun, F.-F.; Huang, J. C.; Leung, G. M.; Holmes, E. C.; Hu, Y.-L.; Guan, Y.; Cao, W. C. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* **2020**, *583*, 282. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>15</sup> Bastos, L. F. C. S (doença causada pelo novo coronavírus) | OPAS/OMS Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875)> Acesso em: 23 Junho 2020.
- <sup>16</sup> Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>> Acesso em: 23 Junho 2020.
- <sup>17</sup> Müller, M. Disponível em: <<https://www.ictq.com.br/varejo-farmaceutico/745-o-mapa-do-diabetes-no-brasil>> Acesso em: 23 Junho 2020.
- <sup>18</sup> Stevens, B.; Pezzullo, L.; Verdian, L.; Tomlinson, J.; George, A.; Bacal, F. The Economic Burden of Heart Conditions in Brazil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2018**, *111*, 29. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>19</sup> Agência IBGE de notícias. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/25882-extrema-pobreza-atinge-13-5-milhoes-de-pessoas-e-chega-ao-maior-nivel-em-7-anos>> Acesso em: 23 Junho 2020.
- <sup>20</sup> Johns Hopkins University (Coronavirus Resource Center). Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>> Acesso em: 29 Junho 2020.

- <sup>21</sup> Romanos, M. T. V.; Santos, N. S. de O.; Wigg, M. D.; *Virologia Humana*, 3a ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2015.
- <sup>22</sup> Guo, Y.-R.; Cao, Q.-D.; Hong, Z.-S.; Tan, Y.-Y.; Chen, S.-D.; Jin, H.-J.; Tan, K.-S.; Wang, D.-Y.; Yan, Y. The Origin, Transmission and Clinical Therapies on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak - an Update on the Status. *Military Medical Research* **2020**, *7*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>23</sup> Wu, A.; Peng, Y.; Huang, B.; Ding, X.; Wang, X.; Niu, P.; Meng, J.; Zhu, Z.; Zhang, Z.; Wang, J.; Sheng, J.; Quan, L.; Xia, Z.; Tan, W.; Cheng, G.; Jiang, T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-NCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe* **2020**, *27*, 325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>24</sup> Donoghue Mary; Hsieh Frank; Baronas Elizabeth; Godbout Kevin; Gosselin Michael; Stagliano Nancy; Donovan Michael; Woolf Betty; Robison Keith; Jeyaseelan Raju; Breitbart Roger E.; Acton Susan. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research* **2000**, *87*, e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>25</sup> Shereen, M. A.; Khan, S.; Kazmi, A.; Bashir, N.; Siddique, R. COVID-19 Infection: Origin, Transmission, and Characteristics of Human Coronaviruses. *Journal of Advanced Research* **2020**, *24*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>26</sup> Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* **2020**, *367*, 1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>27</sup> Liu, Z.; Xiao, X.; Wei, X.; Li, J.; Yang, J.; Tan, H.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Wu, J.; Liu, L. Composition and Divergence of Coronavirus Spike Proteins and Host ACE2 Receptors Predict Potential Intermediate Hosts of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology* **2020**, *92*, 595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>28</sup> Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell Entry Mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS* **2020**, *117*, 11727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Alexandre, J.; Cracowski, J.-L.; Richard, V.; Bouhanick, B. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and COVID-19 Infection. *Annales d'Endocrinologie* **2020**, *81*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>30</sup> Walls, A. C.; Park, Y.-J.; Tortorici, M. A.; Wall, A.; McGuire, A. T.; Velesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **2020**, *181*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>31</sup> Glebov, O. O. Understanding SARS-CoV-2 Endocytosis for COVID-19 Drug Repurposing. *The FEBS Journal* **2020**, *287*, 3664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>32</sup> Conner, S. D.; Schmid, S. L. Identification of an Adaptor-Associated Kinase, AAK1, as a Regulator of Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Cell Biol* **2002**, *156*, 921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>33</sup> Yang, N.; Shen, H.-M. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. *International Journal of Biological Sciences* **2020**, *16*, 1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>34</sup> Parks, J. M.; Smith, J. C. How to Discover Antiviral Drugs Quickly. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 2261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>35</sup> Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; Yuan, M.-L.; Zhang, Y.-L.; Dai, F.-H.; Liu, Y.; Wang, Q.-M.; Zheng, J.-J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y.-Z. A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>36</sup> Cascella, M.; Rajnik, M.; Cuomo, A.; Dulebohn, S. C.; Di Napoli, R.; *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)*. StatPearls Publishing: Treasure Island, 2020. [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Gao, Y.; Yan, L.; Huang, Y.; Liu, F.; Zhao, Y.; Cao, L.; Wang, T.; Sun, Q.; Ming, Z.; Zhang, L.; Ge, J.; Zheng, L.; Zhang, Y.; Wang, H.; Zhu, Y.; Zhu, C.; Hu, T.; Hua, T.; Zhang, B.; Yang, X.; Li, J.; Yang, H.; Liu, Z.; Xu, W.; Guddat, L. W.; Wang, Q.; Lou, Z.; Rao, Z. Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from COVID-19 Virus. *Science* **2020**, *368*, 779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Li, X.; Geng, M.; Peng, Y.; Meng, L.; Lu, S. Molecular Immune Pathogenesis and Diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2020**, *10*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>39</sup> Knoops, K.; Kikkert, M.; Worm, S. H. E. van den; Zevenhoven-Dobbe, J. C.; van der Meer, Y.; Koster, A. J.; Mommaas, A. M.; Snijder, E. J. SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLOS Biology* **2008**, *6*, e226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>40</sup> Snijder, E. J.; Limpens, R. W. A. L.; Wilde, A. H. de; Jong, A. W. M. de; Zevenhoven-Dobbe, J. C.; Maier, H. J.; Faas, F. F. G. A.; Koster, A. J.; Bárcena, M. A Unifying Structural and Functional Model of the Coronavirus Replication Organelle: Tracking down RNA Synthesis. *PLOS Biology* **2020**, *18*, e3000715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>41</sup> Stertz, S.; Reichelt, M.; Spiegel, M.; Kuri, T.; Martínez-Sobrido, L.; García-Sastre, A.; Weber, F.; Kochs, G. The Intracellular Sites of Early Replication and Budding of SARS-Coronavirus. *Virology* **2007**, *361*, 304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>42</sup> Saghazadeh, A.; Rezaei, N. Immune-Epidemiological Parameters of the Novel Coronavirus - a Perspective. *Expert Review of Clinical Immunology* **2020**, *16*, 465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>43</sup> Fu, Y.; Cheng, Y.; Wu, Y. Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Virologica Sinica* **2020**, *35*, 266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>44</sup> Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Y.; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D. S. C.; Du, B.; Li, L.; Zeng, G.; Yuen, K.-Y.; Chen, R.; Tang, C.; Wang, T.; Chen, P.; Xiang, J.; Li, S.; Wang, J.; Liang, Z.; Peng, Y.; Wei, L.; Liu, Y.; Hu, Y.; Peng, P.; Wang, J.; Liu, J.; Chen, Z.; Li, G.; Zheng, Z.; Qiu, S.; Luo, J.; Ye, C.; Zhu, S.; Zhong, N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 1708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>45</sup> Prompetchara, E.; Ketloy, C.; Palaga, T. Immune Responses in COVID-19 and Potential Vaccines: Lessons Learned from SARS and MERS Epidemic. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* **2020**, *38*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>46</sup> Moore, J. B.; June, C. H. Cytokine Release Syndrome in Severe COVID-19. *Science* **2020**, *368*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>47</sup> Chu, H.; Chan, J. F.-W.; Wang, Y.; Yuen, T. T.-T.; Chai, Y.; Hou, Y.; Shuai, H.; Yang, D.; Hu, B.; Huang, X.; Zhang, X.; Cai, J.-P.; Zhou, J.; Yuan, S.; Kok, K.-H.; To, K. K.-W.; Chan, I. H.-Y.; Zhang, A. J.; Sit, K.-Y.; Au, W.-K.; Yuen, K.-Y. Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study with Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clinical Infectious Diseases* **2020**, no prelo. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>48</sup> Cameron, M. J.; Bermejo-Martin, J. F.; Danesh, A.; Muller, M. P.; Kelvin, D. J. Human Immunopathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Virus Research* **2008**, *133*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>49</sup> Yuki, K.; Fujiogi, M.; Koutsogiannaki, S. COVID-19 Pathophysiology: A Review. *Clinical Immunology* **2020**, *215*, 108427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>50</sup> Santos, R. A. S.; Sampaio, W. O.; Alzamora, A. C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M. J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiological Reviews* **2018**, *98*, 505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>51</sup> Costa, I. B. S. da S.; Bittar, C. S.; Rizk, S. I.; Araújo Filho, A. E. de; Santos, K. A. Q.; Machado, T. I. V.; Andrade, F. T. de A.; González, T. B.; Arévalo, A. N. G.; Almeida, J. P. de; Bacal, F.; Oliveira, G. M. M. de; Lacerda, M. V. G. de; Barberato, S. H.; Chagas, A. C. P.; Rochitte, C. E.; Ramires, J. A. F.; Kalil Filho, R.; Hajjar, L. A. O Coração e a COVID-19: O que o Cardiologista Precisa Saber. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2020**, *114*, 805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>52</sup> Zhang, C.; Wu, Z.; Li, J.-W.; Zhao, H.; Wang, G.-Q. Cytokine Release Syndrome in Severe COVID-19: Interleukin-6 Receptor Antagonist Tocilizumab May Be the Key to Reduce Mortality. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2020**, *55*, 105954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>53</sup> Tian, S.; Hu, W.; Niu, L.; Liu, H.; Xu, H.; Xiao, S.-Y. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **2020**, *15*, 700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>54</sup> Xiong, T.-Y.; Redwood, S.; Prendergast, B.; Chen, M. Coronaviruses and the Cardiovascular System: Acute and Long-Term Implications. *European Heart Journal* **2020**, *41*, 1798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>55</sup> South, A. M.; Diz, D. I.; Chappell, M. C. COVID-19, ACE2, and the Cardiovascular Consequences. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2020**, *318*, H1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>56</sup> Strabelli, T. M. V.; Uip, D. E.; Strabelli, T. M. V.; Uip, D. E. COVID-19 e o Coração. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **2020**, *114*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>57</sup> Li, Y.-C.; Bai, W.-Z.; Hashikawa, T. The Neuroinvasive Potential of SARS-CoV2 May Play a Role in the Respiratory Failure of COVID-19 Patients. *Journal of Medical Virology* **2020**, *92*, 552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>58</sup> Lechien, J. R.; Chiesa-Estomba, C. M.; De Siati, D. R.; Horoi, M.; Le Bon, S. D.; Rodriguez, A.; Dequanter, D.; Blecic, S.; El Afia, F.; Distinguin, L.; Chekkoury-Idrissi, Y.; Hans, S.; Delgado, I. L.; Calvo-Henriquez, C.; Lavigne, P.; Falanga, C.; Barillari, M. R.; Cammaroto, G.; Khalife, M.; Leich, P.; Souchay, C.; Rossi, C.; Journe, F.; Hsieh, J.; Edjlali, M.; Carlier, R.; Ris, L.; Lovato, A.; De Filippis, C.; Coppee, F.; Fakhry, N.; Ayad, T.; Saussez, S. Olfactory and Gustatory Dysfunctions as a Clinical Presentation of Mild-to-Moderate Forms of the Coronavirus Disease (COVID-19): A Multicenter European Study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **2020**, *277*, 2251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>59</sup> Finsterer, J.; Stollberger, C. Update on the Neurology of COVID-19. *Journal of Medical Virology* **2020**, no prelo. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>60</sup> Aires, M. de M.; *Fisiologia*, 5a. Ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2018.
- <sup>61</sup> Martinez-Rojas, M. A.; Vega-Vega, O.; Bobadilla, N. A. Is the Kidney a Target of SARS-CoV-2? *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2020**, *318*, F1454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>62</sup> Fanelli, V.; Fiorentino, M.; Cantaluppi, V.; Gesualdo, L.; Stallone, G.; Ronco, C.; Castellano, G. Acute Kidney Injury in SARS-CoV-2 Infected Patients. *Critical Care* **2020**, *24*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>63</sup> Imai, Y.; Kuba, K.; Rao, S.; Huan, Y.; Guo, F.; Guan, B.; Yang, P.; Sarao, R.; Wada, T.; Leong – Poi, H. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, **2005**, *436*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>64</sup> Stopsack, K. H.; Mucci, L. A.; Antonarakis, E. S.; Nelson, P. S.; Kantoff, P. W. TMPRSS2 and COVID-19: Serendipity or Opportunity for Intervention? *Cancer Discovery* **2020**, *10*, 779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>65</sup> Squire, J. A.; Park, P. C.; Yoshimoto, M.; Alami, J.; Williams, J. L.; Evans, A.; Joshua, A. M. Prostate Cancer as a Model System for Genetic Diversity in Tumors. *Advances in Cancer Research* **2011**, *112*, 183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>66</sup> Iwata-Yoshikawa, N.; Okamura, T.; Shimizu, Y.; Hasegawa, H.; Takeda, M.; Nagata, N. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *Journal of Virology* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>67</sup> Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>68</sup> Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Krüger, N.; Müller, M.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. The Novel Coronavirus 2019 (2019-NCoV) Uses the SARS-Coronavirus Receptor ACE2 and the Cellular Protease TMPRSS2 for Entry into Target Cells. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
- <sup>69</sup> Gagnon, S. M.L.; Legg, M. G.; Sindhuwinata, N.; A Letts, J.; Johal, A. R.; Schuman, B.; Borisova, S. N.; Palcic, M. M.; Peters, T.; Evans, S.V. High-resolution crystal structures and STD NMR mapping of human ABO(H) blood group glycosyltransferases in complex with trisaccharide reaction products suggest a molecular basis for product release. *Glycobiology* **2017**, *27*, 966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>70</sup> Sonawane, K.; Barale, S. S.; Dhanavade, M. J.; Waghmare, S. R.; Nadaf, N. H.; Kamble, S. A.; Mohammed, A. A.; Makandar, A. M.; Fandilolu, P. M.; Dound, A. S.; Naik, N. M. Homology Modeling and Docking Studies of TMPRSS2 with Experimentally Known Inhibitors Camostat Mesylate, Nafamostat and Bromhexine Hydrochloride to Control SARS-Coronavirus-2. *ChemRxiv*, **2020**. [[CrossRef](#)]
- <sup>71</sup> McKee, D. L.; Sternberg, A.; Stange, U.; Laufer, S.; Naujokat, C. Candidate Drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. *Pharmacol Research* **2020**, *157*, 104859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>72</sup> Hoffmann, M.; Schroeder, S.; Kleine-Weber, H.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2020**, *64*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>73</sup> Azimi, A. TMPRSS2 inhibitors, Bromhexine, Aprotinin, Camostat and Nafamostat as potential treatments for COVID-19. *Frenxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
- <sup>74</sup> Braun, E.; Sauter, D. Furin-Mediated Protein Processing in Infectious Diseases and Cancer. *Clinical & Translational Immunology* **2019**, *8*, e1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>75</sup> Usul Afsar, C. 2019-NCoV-SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: Cruciality of Furin and Relevance With Cancer. *Medical Hypotheses* **2020**, *140*, 109770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>76</sup> Fernandez, C.; Rysä, J.; Almgren, P.; Nilsson, J.; Engström, G.; Orho-Melander, M.; Ruskoaho, H.; Melander, O. Plasma Levels of the Proprotein Convertase Furin and Incidence of Diabetes and Mortality. *Journal of Internal Medicine* **2018**, *284*, 377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>77</sup> Drak Alsibai, K. Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Proteases in COVID-19 Patients: A Potential Role of Cellular FURIN in the Pathogenesis of SARS-CoV-2. *Medical Hypotheses* **2020**, *143*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>78</sup> Hasan, A.; Paray, B. A.; Hussain, A.; Qadir, F. A.; Attar, F.; Aziz, F. M.; Sharifi, M.; Derakhshankhah, H.; Rasti, B.; Mehrabi, M.; Shahpasand, K.; Saboury, A. A.; Falahati, M. A Review on the Cleavage Priming of the Spike Protein on Coronavirus by Angiotensin-Converting Enzyme-2 and Furin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>79</sup> Lima, L. N. G. C.; Sousa, M. S. de; Lima, K. V. B. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. *Journal of Health & Biological Sciences* **2020**, *8*, 1. [CrossRef]
- <sup>80</sup> Wang, Q.; Qiu, Y.; Li, J.-Y.; Zhou, Z.-J.; Liao, C.-H.; Ge, X.-Y. A Unique Protease Cleavage Site Predicted in the Spike Protein of the Novel Pneumonia Coronavirus (2019-NCoV) Potentially Related to Viral Transmissibility. *Virologica Sinica* **2020**, *35*, 337. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>81</sup> Li, W. A Furin Cleavage Site Inserted into the Spike Protein of SARS-CoV-2: A Structural Implication? **2020**, preprint. [CrossRef]
- <sup>82</sup> Fan, K.; Wei, P.; Feng, Q.; Chen, S.; Huang, C.; Ma, L.; Lai, B.; Pei, J.; Liu, Y.; Chen, J.; Lai, L. Biosynthesis, Purification, and Substrate Specificity of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-like Proteinase. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 1637. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>83</sup> Pillaiyar, T.; Manickam, M.; Namasivayam, V.; Hayashi, Y.; Jung, S.-H. An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 6595. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>84</sup> Muramatsu, T.; Takemoto, C.; Kim, Y.-T.; Wang, H.; Nishii, W.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. SARS-CoV 3CL Protease Cleaves Its C-Terminal Autoprocessing Site by Novel Subsite Cooperativity. *PNAS* **2016**, *113*, 12997. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>85</sup> Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhwani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science* **2003**, *300*, 1763. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>86</sup> Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved  $\alpha$ -Ketoamide Inhibitors. *Science* **2020**, *368*, 409. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>87</sup> Sang, P.; Tian, S.-H.; Meng, Z.-H.; Yang, L.-Q. Anti-HIV Drug Repurposing against SARS-CoV-2. *RSC Advances* **2020**, *10*, 15775. [CrossRef]
- <sup>88</sup> Jin, Z.; Du, X.; Xu, Y.; Deng, Y.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; Duan, Y.; Yu, J.; Wang, L.; Yang, K.; Liu, F.; Jiang, R.; Yang, X.; You, T.; Liu, X.; Yang, X.; Bai, F.; Liu, H.; Liu, X.; Guddat, L. W.; Xu, W.; Xiao, G.; Qin, C.; Shi, Z.; Jiang, H.; Rao, Z.; Yang, H. Structure of M pro from SARS-CoV-2 and Discovery of Its Inhibitors. *Nature* **2020**, *582*, 289. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>89</sup> Yang, H.; Yang, M.; Ding, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mo, L.; Ye, S.; Pang, H.; Gao, G. F.; Anand, K.; Bartlam, M.; Hilgenfeld, R.; Rao, Z. The Crystal Structures of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Main Protease and Its Complex with an Inhibitor. *PNAS* **2003**, *100*, 13190. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>90</sup> Chandwani, A.; Shuter, J. Lopinavir/Ritonavir in the Treatment of HIV-1 Infection: A Review. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **2008**, *4*, 1023. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>91</sup> Flexner, C. HIV-Protease Inhibitors. *The New England Journal of Medicine* **1998**, *338*, 1281. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>92</sup> U.S. Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>> Acesso em: 23 junho 2020.
- <sup>93</sup> Kumar, G. N.; Dykstra, J.; Roberts, E. M.; Jayanti, V. K.; Hickman, D.; Uchic, J.; Yao, Y.; Surber, B.; Thomas, S.; Granneman, G. R. Potent Inhibition of the Cytochrome P-450 3A-Mediated Human Liver Microsomal Metabolism of a Novel HIV Protease Inhibitor by Ritonavir: A Positive Drug-Drug Interaction. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, *27*, 902. [PubMed]
- <sup>94</sup> Sisay, M. 3CLpro Inhibitors as a Potential Therapeutic Option for COVID-19: Available Evidence and Ongoing Clinical Trials. *Pharmacological Research* **2020**, *156*, 104779. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>95</sup> Choy, K.-T.; Wong, A. Y.-L.; Kaewpreedee, P.; Sia, S. F.; Chen, D.; Hui, K. P. Y.; Chu, D. K. W.; Chan, M. C. W.; Cheung, P. P.-H.; Huang, X.; Peiris, M.; Yen, H.-L. Remdesivir, Lopinavir, Emetine, and Homoharringtonine Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vitro. *Antiviral Research* **2020**, *178*, 104786. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>96</sup> Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; Fan, G.; Ruan, L.; Song, B.; Cai, Y.; Wei, M.; Li, X.; Xia, J.; Chen, N.; Xiang, J.; Yu, T.; Bai, T.; Xie, X.; Zhang, L.; Li, C.; Yuan, Y.; Chen, H.; Li, H.; Huang, H.; Tu, S.; Gong, F.; Liu, Y.; Wei, Y.; Dong, C.; Zhou, F.; Gu, X.; Xu, J.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Li, H.; Shang, L.; Wang, K.; Li, K.; Zhou, X.; Dong, X.; Qu, Z.; Lu, S.; Hu, X.; Ruan, S.; Luo, S.; Wu, J.; Peng, L.; Cheng, F.; Pan, L.; Zou, J.; Jia, C.; Wang, J.; Liu, X.; Wang, S.; Wu, X.; Ge, Q.; He, J.; Zhan, H.; Qiu, F.; Guo, L.; Huang, C.; Jaki, T.; Hayden, F. G.; Horby, P. W.; Zhang, D.; Wang, C. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 1787. [CrossRef] [PubMed]

- <sup>97</sup> Chen, Y. W.; Yiu, C.-P. B.; Wong, K.-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like Protease (3CL pro) Structure: Virtual Screening Reveals Velpatasvir, Ledipasvir, and Other Drug Repurposing Candidates. *F1000Res* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>98</sup> Báez-Santos, Y. M.; St. John, S. E.; Mesecar, A. D. The SARS-Coronavirus Papain-like Protease: Structure, Function and Inhibition by Designed Antiviral Compounds. *Antiviral Research* **2015**, *115*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>99</sup> Mielech, A. M.; Chen, Y.; Mesecar, A. D.; Baker, S. C. Nidovirus Papain-like Proteases: Multifunctional Enzymes with Protease, Deubiquitinating and DeISGylating Activities. *Virus Research* **2014**, *194*, 184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>100</sup> Freitas, B. T.; Durie, I. A.; Murray, J.; Longo, J. E.; Miller, H. C.; Crich, D.; Hogan, R. J.; Tripp, R. A.; Pegan, S. D. Characterization and Noncovalent Inhibition of the Deubiquitinase and DeISGylase Activity of SARS-CoV-2 Papain-Like Protease. *ACS Infectious Disease* **2020**, *6*, 2099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>101</sup> Bett, J. S. Proteostasis Regulation by the Ubiquitin System. *Essays Biochemistry* **2016**, *60*, 143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>102</sup> Clemente, V.; D'Arcy, P.; Bazzaro, M. Deubiquitinating Enzymes in Coronaviruses and Possible Therapeutic Opportunities for COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 3492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>103</sup> Lin, D.; Zhong, B. Regulation of Cellular Innate Antiviral Signaling by Ubiquitin Modification. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2015**, *47*, 149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>104</sup> Devaraj, S. G.; Wang, N.; Chen, Z.; Chen, Z.; Tseng, M.; Barretto, N.; Lin, R.; Peters, C. J.; Tseng, C.-T. K.; Baker, S. C.; Li, K. Regulation of IRF-3-Dependent Innate Immunity by the Papain-like Protease Domain of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 32208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>105</sup> Sun, L.; Xing, Y.; Chen, X.; Zheng, Y.; Yang, Y.; Nichols, D. B.; Clementz, M. A.; Banach, B. S.; Li, K.; Baker, S. C.; Chen, Z. Coronavirus Papain-like Proteases Negatively Regulate Antiviral Innate Immune Response through Disruption of STING-Mediated Signaling. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e30802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>106</sup> Frieman, M.; Ratia, K.; Johnston, R. E.; Mesecar, A. D.; Baric, R. S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Papain-like Protease Ubiquitin-like Domain and Catalytic Domain Regulate Antagonism of IRF3 and NF-KappaB Signaling. *Journal of Virology* **2009**, *83*, 6689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>107</sup> Clementz, M. A.; Chen, Z.; Banach, B. S.; Wang, Y.; Sun, L.; Ratia, K.; Baez-Santos, Y. M.; Wang, J.; Takayama, J.; Ghosh, A. K.; Li, K.; Mesecar, A. D.; Baker, S. C. Deubiquitinating and Interferon Antagonism Activities of Coronavirus Papain-like Proteases. *Journal of Virology* **2010**, *84*, 4619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>108</sup> Lin, M.-H.; Moses, D. C.; Hsieh, C.-H.; Cheng, S.-C.; Chen, Y.-H.; Sun, C.-Y.; Chou, C.-Y. Disulfiram Can Inhibit MERS and SARS Coronavirus Papain-like Proteases via Different Modes. *Antiviral Research* **2018**, *150*, 155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>109</sup> Sargsyan, K.; Lin, C.-C.; Chen, T.; Grauffel, C.; Chen, Y.-P.; Yang, W.-Z.; Yuan, H. S.; Lim, C. Multi-Targeting of Functional Cysteines in Multiple Conserved SARS-CoV-2 Domains by Clinically Safe Zn-Ejectors. *ChemRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
- <sup>110</sup> Lee YM, Duh Y, Wang ST, Lai MM, Yuan HS, Lim C. Using an Old Drug to Target a New Drug Site: Application of Disulfiram to Target the Zn-Site in HCV NS5A Protein. *Journal of American Chemical Society* **2016**, *138*, 3856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>111</sup> Yin, W.; Mao, C.; Luan, X.; Shen, D.-D.; Shen, Q.; Su, H.; Wang, X.; Zhou, F.; Zhao, W.; Gao, M.; Chang, S.; Xie, Y.-C.; Tian, G.; Jiang, H.-W.; Tao, S.-C.; Shen, J.; Jiang, Y.; Jiang, H.; Xu, Y.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Xu, H. E. Structural Basis for Inhibition of the RNA-Dependent RNA Polymerase from SARS-CoV-2 by Remdesivir. *Science* **2020**, *368*, 1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>112</sup> Huang, J.; Song, W.; Huang, H.; Sun, Q. Pharmacological Therapeutics Targeting RNA-Dependent RNA Polymerase, Proteinase and Spike Protein: From Mechanistic Studies to Clinical Trials for COVID-19. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, *9*, 1131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>113</sup> Shannon, A.; Selisko, B.; Le, N. T. T.; Huchting, J.; Touret, F.; Piorkowski, G.; Fattorini, V.; Ferron, F.; Decroly, E.; Meier, C.; Coutard, B.; Peersen, O.; Canard, B. Favipiravir Strikes the SARS-CoV-2 at Its Achilles Heel, the RNA Polymerase. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>114</sup> Coomes, E. A.; Haghbayan, H. Favipiravir, an Antiviral for COVID-19? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2020**, *75*, 2013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>115</sup> Cai, Q.; Yang, M.; Liu, D.; Chen, J.; Shu, D.; Xia, J.; Liao, X.; Gu, Y.; Cai, Q.; Yang, Y.; Shen, C.; Li, X.; Peng, L.; Huang, D.; Zhang, J.; Zhang, S.; Wang, F.; Liu, J.; Chen, L.; Chen, S.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Cao, R.; Zhong, W.; Liu, Y.; Liu, L. Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. *Engineering* **2020**, *no prelo*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>116</sup> Eastman, R. T., Roth, J. S., Brimacombe, K. R., Simeonov, A., Shen, M., Patnaik, S., & Hall, M. D. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Central Science*, **2020**, *6*, 672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>117</sup> Gordon, C. J.; Tchesnokov, E. P.; Woolner, E.; Perry, J. K.; Feng, J. Y.; Porter, D. P.; Gotte, M. Remdesivir Is a Direct-Acting Antiviral That Inhibits RNA-Dependent RNA Polymerase from Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 with High Potency. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295*, 6785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>118</sup> Wang, M.; Cao, R.; Zhang, L.; Yang, X.; Liu, J.; Xu, M.; Shi, Z.; Hu, Z.; Zhong, W.; Xiao, G. Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) in Vitro. *Cell Research* **2020**, *30*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>119</sup> Jorgensen SCJ, Kebriaei R, Dresser LD. Remdesivir: Review of Pharmacology, Pre-clinical Data, and Emerging Clinical Experience for COVID-19. *Pharmacotherapy* **2020**, *40*, 659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>120</sup> Grein, J.; Ohmagari, N.; Shin, D.; Diaz, G.; Asperges, E.; Castagna, A.; Feldt, T.; Green, G.; Green, M. L.; Lescure, F. X.; Nicastrì, E.; Oda, R., Yo, K.; Quiros-Roldan, E.; Studemeister, A.; Redinski, J.; Ahmed, S.; Bennett, J.; Chelliah, D.; Chen, D.; ... Flanigan, T. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *The New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 2327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>121</sup> Richardson, P.; Griffin, I.; Tucker, C.; Smith, D.; Oechsle, O.; Phelan, A.; Rawling, M.; Savory, E.; Stebbing, J. Baricitinib as Potential Treatment for 2019-nCoV Acute Respiratory Disease. *Lancet* **2020**, *395*, e30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>122</sup> Carrière, F.; Longhi, S.; Record, M. The Endosomal Lipid Bis(Monoacylglycerol) Phosphate as a Potential Key Player in the Mechanism of Action of Chloroquine against SARS-COV-2 and Other Enveloped Viruses Hijacking the Endocytic Pathway. *Biochimie* **2020**, no prelo. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>123</sup> Geleris J.; Sun Y.; Platt J.; Zucker, J.; Baldwin M.; Hripcsak, G.; Labella, A.; Manson, D. K.; Kubin, C.; Barr, R. G.; Sobieszczyk, M. E.; Scheluger, N. W. Observational Study of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *The New England Journal of Medicine* **2020**, *382*, 2411. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>124</sup> Pacheco, R. L.; Riera, R. Hydroxychloroquine and chloroquine for COVID-19 infection. Rapid systematic review. *Journal of Evidence-Based Healthcare*, **2020**, *2*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>125</sup> Sorrell F. J.; Szklarz M.; Abdul Azeez KR.; Elkins JM.; Knapp S. Family-wide Structural Analysis of Human Numb-Associated Protein Kinases. *Structure*. **2016**, *24*, 401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>126</sup> Cantini, F.; Niccoli, L.; Matarrese, D.; Nicastrì, E.; Stobbione, P.; Goletti, D. Baricitinib Therapy in COVID-19: A Pilot Study on Safety and Clinical Impact. *Journal of Infection* **2020**, *81*, 318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>127</sup> Richardson, P.; Griffin, I.; Tucker, C.; Smith, D.; Oechsle, O.; Phelan, A.; Rawling, M.; Savory, E.; & Stebbing, J. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet* **2020**, *395*, e30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>128</sup> Varghese, J. N.; Moritz, R. L.; Lou, M.-Z.; Donkelaar, A. van; Ji, H.; Ivancic, N.; Branson, K. M.; Hall, N. E.; Simpson, R. J. Structure of the Extracellular Domains of the Human Interleukin-6 Receptor  $\alpha$ -Chain. *PNAS* **2002**, *99*, 15959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>129</sup> McGonagle, D.; Sharif, K.; O'Regan, A.; Bridgewood, C. The Role of Cytokines Including Interleukin-6 in COVID-19 Induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmunity Reviews* **2020**, *19*, 102537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>130</sup> Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* **2006**, *8*, s3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>131</sup> Hodes, G. E.; Ménard, C.; Russo, S. J. Integrating Interleukin-6 into Depression Diagnosis and Treatment. *Neurobiology of Stress* **2016**, *4*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>132</sup> Volp, A. C. P.; Alfenas, R. de C. G.; Costa, N. M. B.; Minim, V. P. R.; Stringueta, P. C.; Bressan, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* **2008**, *52*, 537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>133</sup> Srirangan, S.; Choy, E. H. The Role of Interleukin 6 in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis: *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* **2010**, 247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>134</sup> Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Müller-Newen, G.; Schaper, F.; Graeve, L. Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the Gp130/Jak/STAT Pathway. *Biochemical Journal* **1998**, *334*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>135</sup> Scheller, J.; Chalaris, A.; Schmidt-Arras, D.; Rose-John, S. The Pro- and Anti-Inflammatory Properties of the Cytokine Interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2011**, *1813*, 878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- <sup>136</sup> Boulanger, M. J.; Chow, D.; Brevnova, E. E.; Garcia, K. C. Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/IL-6  $\alpha$ -Receptor/Gp130 Complex. *Science* **2003**, *300*, 2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>137</sup> Sebba, A. Tocilizumab: The First Interleukin-6-Receptor Inhibitor. *American Journal of Health-System Pharmacy* **2008**, *65*, 1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>138</sup> Xu, X.; Han, M.; Li, T.; Sun, W.; Wang, D.; Fu, B.; Zhou, Y.; Zheng, X.; Yang, Y.; Li, X.; Zhang, X.; Pan, A.; Wei, H. Effective Treatment of Severe COVID-19 Patients with Tocilizumab. *PNAS* **2020**, *117*, 10970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>139</sup> Yan, R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xia, L.; Guo, Y.; Zhou, Q. Structural Basis for the Recognition of SARS-CoV-2 by Full-Length Human ACE2. *Science* **2020**, *367*, 1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>140</sup> Xia, S.; Liu, M.; Wang, C.; Xu, W.; Lan, Q.; Feng, S.; Qi, F.; Bao, L.; Du, L.; Liu, S.; Qin, C.; Sun, F.; Shi, Z.; Zhu, Y.; Jiang, S.; Lu, L. Inhibition of SARS-CoV-2 (Previously 2019-NCoV) Infection by a Highly Potent Pan-Coronavirus Fusion Inhibitor Targeting Its Spike Protein That Harbors a High Capacity to Mediate Membrane Fusion. *Cell Research* **2020**, *30*, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>141</sup> Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; Wang, X. Structure of the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain Bound to the ACE2 Receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>142</sup> Chen, X., Li, R., Pan, Z., Qian, C., Yang, Y., You, R., Zhao, J., Liu, P., Gao, L., Li, Z., Huang, Q., Xu, L., Tang, J., Tian, Q., Yao, W., Hu, L., Yan, X., Zhou, X., Wu, Y., Deng, K., ... Ye, L. Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor. *Cellular & molecular immunology*, **2020**, *17*, 647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>143</sup> Robson B. COVID-19 Coronavirus spike protein analysis for synthetic vaccines, a peptidomimetic antagonist, and therapeutic drugs, and analysis of a proposed achilles' heel conserved region to minimize probability of escape mutations and drug resistance. *Computers in Biology and Medicine* **2020**, *121*, 103749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>144</sup> Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B. J., & Jiang, S. The spike protein of SARS-CoV—a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology* **2009**, *7*, 226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]