



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PRISCILA COSTA SILVA

**PREDIÇÃO IN SÍLICO DA AFINIDADE DO NEBIVOLOL A PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2, ATRAVÉS DE UM ESTUDO DE
DOÇAGEM MOLECULAR.**

PARNAÍBA

2021

PRISCILA COSTA SILVA

**PREDIÇÃO IN SÍLICO DA AFINIDADE DO NEBIVOLOL A PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2, ATRAVÉS DE UM ESTUDO DE
DOCAGEM MOLECULAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia

Orientador: Jand Venes Rolim Medeiros

PARNAÍBA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Prof. Cândido Athayde Serviço de
Processamento Técnico

S586p Silva, Priscila Costa

Predição in silico da afinidade do nebulolol a proteínas envolvidas na infecção por SARS-Cov-2, através de um estudo de docagem molecular [recurso eletrônico] / Priscila Costa Silva. – 2021.

1 Arquivo em PDF

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2021.

Orientação: Jand Venes Rolim Medeiros

1. Docagem Molecular. 2. SARS-CoV-2. 3. ACE 2. 4. Nebivolol. I.
Titulo.

CDD: 616.019 4

PRISCILA COSTA SILVA

PREDIÇÃO IN SÍLICO DA AFINIDADE DO NEBIVOLOL A PROTEÍNAS
ENVOLVIDAS NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2, ATRAVÉS DE UM ESTUDO DE
DOCAGEM MOLECULAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovada em: 23/03/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros
Universidade Federal do Piauí (Orientador)



Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)



Prof. Dr. Lucas Antonio Duarte Nicolau
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Á Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de chegar tão longe, á minha família por nunca medir esforços para que meus sonhos se realizassem, aos amigos e á equipe LAFIDG.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer á **Deus** pelo dom que é viver e poder desfrutar de oportunidades únicas, por nunca soltar a minha mão e me guiar em todos os momentos.

Obrigada **aos meus pais, Acelino Fonsêca e Maria Ivaneide**, que nunca mediram esforços para me ensinar o caminho do bem, e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Sem vocês, eu não chegaria até aqui. O amor que sinto por vocês é incondicional. A toda a minha família em especial **minha avó Francisca e minha irmã Silvia**, por serem minha companhia durante esses anos, vocês são sinônimo de amor e união. Obrigada por acreditar no meu sonho e sempre me motivar a seguir em frente.

Ao meu orientador, professor Jand Venes, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por me aceitar como aluna de iniciação científica no momento que eu mais pensei em desistir, obrigada pela confiança e por sempre fazer de tudo para que seus alunos cresçam e se destaquem. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação.

Agradeço também a toda **a equipe/família LAFIDG** que sempre me ajudaram, desde a minha entrada no laboratório até hoje. Aos alunos de iniciação científica, Samara, Gabrielle, Katriane, Júnior, Darllan, Jelson muito obrigada pela ajuda, pela companhia, pelas risadas, vocês são maravilhosos. Aos doutores, doutorandos e mestrandos, Nayara, Thiago, Bia, Gabriela, Paty, Isabela, Bruno, Sarah, André, Andreza que sempre me ajudaram, tirando dúvidas, trocando conhecimento, meu muito obrigada. Ao Esley e Letícia que formaram um trio comigo no TCC e que continuam comigo até hoje, me ajudando e me aturando. Aos demais integrantes do laboratório que estão distantes, em outros estados, mas que nunca deixam de nos ajudar, mesmo que seja com uma simples mensagem.

Aos professores da graduação e do programa de pós-graduação, pelos ensinamentos repassados e por serem inspiração de profissionais.

Aos amigos da graduação que levo em meu coração apesar da distancia, em especial a Raiane e Hanna Maísa, que sempre ouvem minhas lamúrias, me aconselham e me proporcionam momentos felizes.

A todos os amigos de infância que mesmo estando tão longe se fazem presentes e conseguem ser companhia e trazer alegria nos meus momentos de tristeza e desânimo.

Aos Parceiros Jefferson Rocha, Paulo Sérgio por toda paciência em me ensinar a compreender um “mundo” totalmente novo, que é a docagem molecular e por possibilitarem a realização desse projeto. **Ao professor Lucas Nicolau**, por sempre se mostrar disposto a ensinar, discutir assuntos pertinentes ao trabalho, além de fazer parte da banca examinadora.

A Universidade Federal do Piauí, CNPQ, FAPEPI e Programa de Pós graduação em biotecnologia que tornam a realização desse projeto possível.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, ‘planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro’. (Jeremias 29:11)

RESUMO

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus (CoV) foi determinado como responsável por um surto de pneumonia atípica potencialmente fatal, definida como doença do coronavírus-19 (COVID-19), causada pela síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2), em Wuhan, na China. Até o momento, não há medicamentos realmente eficazes para tais infecções, tornando o desenvolvimento de terapias medicamentosas de suma importância. Uma opção mais rápida e eficaz nesse sentido é o estudo para a utilização de medicamentos que já foram aprovados para uso em humanos, conhecido como reposicionamento de drogas. Neste trabalho foi utilizado o cloridrato de nebivolol (NEB), um fármaco de terceira geração, beta-adrenoceptor antagonista, β_1 seletivo, com propriedades vasodilatadoras e antioxidantes, utilizado no tratamento de hipertensão, atuando diretamente no sistema renina-angiotensina (RAS). O objetivo deste estudo foi analisar a afinidade do nebivolol a proteínas que estão envolvidas, desde a entrada viral até sua replicação, através de um estudo de docagem molecular. Para tanto, foram realizados os seguintes procedimentos: obtenção das estruturas tridimensionais das proteínas no *Protein Data Bank* (PDB); levantamento de dados referentes ao ligante e sua estrutura tridimensional pelo Drugbank, otimização dessas estruturas e por fim, o estudo de docagem molecular, com a utilização de programas computacionais como AutodockTools, LigPlot e Pymol. O resultado de docagem molecular mostrou que houve interação entre todos os complexos formados (ligante/proteína), com energias de ligação igual a $-9.48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para proteína S no estado fechado (6VXX), $-7.06 \text{ kcal.mol}^{-1}$ no estado aberto (6VYB), $-7.32 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para Mpro (6Y2E), $-5.46 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para ADAM-17 (2DDF), $-5.45 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para catepsina L (2XU3), $-5.26 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para TMPRSS2 (2OQ5), $-4.94 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para o domínio RBD (6LZG), e $-4.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para ECA2 (1R42). As melhores energias obtidas foram com a proteína S e a Mpro, indicando assim que o ligante pode estar atuando tanto na entrada viral quanto no processo de replicação. Estudos adicionais devem ser realizados para elucidar o papel antiviral do nebivolol, porém essa abordagem virtual inicial já direciona para possíveis alvos e mecanismos utilizados pelo nebivolol, visto que em comparação com alguns medicamentos usados na clínica, o NEB demonstrou melhor energia. Portanto, a avaliação da afinidade desse ligante aos alvos em questão é indispensável para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o novo coronavírus.

Palavras-chave: Docagem molecular, SARS-CoV-2, ACE 2, Nebivolol.

ABSTRACT

In December 2019, a new coronavirus (CoV) was determined to be responsible for an outbreak of potentially fatal atypical pneumonia, defined as coronavirus-19 disease (COVID-19), caused by severe acute coronavirus 2 respiratory syndrome (SARS-CoV -2) in Wuhan, China. So far, there are no really effective drugs for such infections, making the development of drug therapies of paramount importance. A faster and more effective option in this regard is the study for the use of drugs that have already been approved for use in humans, known as drug repositioning. In this work, nebivolol hydrochloride (NEB), a third generation drug, beta-adrenoceptor antagonist, selective β_1 , with vasodilating and antioxidant properties, was used in the treatment of hypertension, acting directly on the renin-angiotensin system (RAS). The aim of this study was to analyze the affinity of nebivolol on the proteins that are involved, from viral entry to replication, through a molecular docking study. For this, the following procedures were carried out: obtaining the three-dimensional structures of proteins in the Protein Data Bank (PDB); survey of data related to the ligand and its three-dimensional structure by Drugbank, optimization of these structures and finally, the study of molecular docking, using computer programs such as AutodockTools, LigPlot and Pymol. The result of molecular docking showed that there was interaction between all complexes formed (ligand / protein), with binding energies equal to -9.48 kcal.mol⁻¹ for protein S in the closed state (6VXX), -7.06 kcal / mol⁻¹ in the open state (6VYB), -7.32 kcal / mol⁻¹ for Mpro (6Y2E), -5.46 kcal / mol⁻¹ for ADAM-17 (2DDF), -5.45 kcal.mol⁻¹ for cathepsin L (2XU3), - 5.26 kcal.mol⁻¹ for TMPRSS2 (2OQ5), -4.94 kcal.mol⁻¹ for the RBD domain (6LZG), and -4.84 kcal.mol⁻¹ for ECA2 (1R42). The best energies obtained were with protein S and Mpro, thus indicating that the ligand may be acting both in viral entry and in the replication process. Additional studies should be carried out to elucidate the antiviral role of nebivolol, however this initial virtual approach already points to possible targets and mechanisms used by nebivolol, since compared to some drugs used in the clinic, NEB demonstrated better energy. Therefore, the evaluation of the affinity of this ligand to the targets in question is indispensable for the development of therapeutic strategies against the new coronavirus.

Keywords: Molecular docking, SARS-CoV-2, ACE 2, Nebivolol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3CLpro**- Protease principal do coronavírus
- ACE**- Enzima Conversora de Angiotensina
- ACE2**- Enzima Conversora de Angiotensina 2
- ADAM-17**- Metalopeptidase de domínio 17
- ADT**- Autodock Tools
- Ang I**- Angiotensina I
- Ang II**- Angiotensina II
- BatCoV**- Coronavírus de morcego
- CDC**- Centro de Controle e Prevenção de Doença
- CoV**- Coronavírus
- COVID-19**- Doença do coronavirus 2019
- CQ**- Cloroquina
- CTSL**- Protease catepsina L
- DC**- Doenças Transmissíveis
- DCNT**- Doenças Não Transmissíveis
- DFT**- Teoria do Funcionamento da Densidade
- DM**- Docagem molecular
- FDA**- Food and Drug Administration
- HCQ**- Hidroxicloroquina
- LGA**- Algoritmo Genético Lamarckiano
- NEB**- Nebivolol
- Nsp**- Proteína não estrutural
- NO**- Óxido Nítrico
- OMS**- Organização Mundial de Saúde
- OPLS-AA/L**- Potenciais Otimizados para Simulações de Líquidos
- PDB**- Protein Data Bank
- PLPro**- Protease tipo papaína
- RAAS**- Sistema renina-angiotensina-aldosterona
- RAMs**- Reações Adversas a Medicamentos
- RAS**- Sistema Renina-angiotensina
- RBD**- Domínio de ligação ao receptor

RMSD- Desvio médio quadrático da raiz

RNA- Ácido Ribonucleico

SARS- Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2- Síndrome Respiratória Aguda Grave do coronavírus 2

SBDD- Estrutura baseada no design de drogas

SBVS- Triagem Virtual Baseada em Estrutura

SNS- Sistema Nervoso Simpático

TMPRSS2- Protease serina 2 transmembrana

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Estrutura do novo coronavírus.....	16
Figura 2- Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	18
Figura 3- Mecanismo de entrada viral - principais proteínas.....	20
Figura 4- Ranking dos países com maior número de casos e mortes COVID-19.....	21
Figura 5- Casos acumulados de COVID-19 por data de notificação.....	22
Figura 6- Interação entre ligante e o sítio ativo da proteína-alvo.....	25
Figura 7- Estrutura química do nebivolol.....	26
Figura 8 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/proteína S (6VXX 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	35
Figura 9 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/Mpro (6Y2E 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	36
Figura 10 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/proteína S (6VYB 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	37
Figura 11 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/Adam-17 (2DDF) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	38
Figura 12 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/catepsina L (2XU3 1) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações hidrofóbicas (B).....	39
Figura 13 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/TMPRSS2 (2OQ5 1) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	40
Figura 14 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/RBD (6LZG) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	41
Figura 15 - Docagem molecular 3D do complexo NEB/ECA2 (1R42) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).....	42
Tabela 1- Alvos testados, códigos PDB e coordenadas indicando o sítio ativo.....	30
Tabela 2- Resultados de energia de ligação, constante de inibição dos complexos.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 DOENÇA DO CORONAVÍRUS 19 (COVID 19)	16
2.2 MECANISMO DE ENTRADA DO VÍRUS NO HOSPEDEIRO	17
2.2.1 Enzima conversora de Angiotensina II (ECA2)	17
2.2.2 Outras proteases envolvidas na entrada viral	18
2.3 SINTOMATOLOGIA E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	21
2.4 OPÇÕES TERAPÊUTICAS	23
2.5 DOCAGEM MOLECULAR	24
2.6 NEBIVOLOL	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS (3D)	31
4.2 DETALHES COMPUTACIONAIS	32
4.3 ENSAIOS DE DOCKING MOLECULAR (DM)	32
4.4 ANÁLISE DA INTERFACE DOS COMPLEXOS	33
5 RESULTADOS	34
5.1 DOCAGEM MOLECULAR	34
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	50
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados da família dos Coronaviridae com um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (FEHR; PERLMAN, 2015). O tamanho do genoma dos CoVs é relativamente grande, em média 30 kb. O envelope do vírus contém uma bicamada lipídica com três proteínas estruturais: membrana (M), envelope (E) e pico (S) (BOOPATHI et al., 2020). A proteção viral fora do hospedeiro é fornecida pela bicamada lipídica, nucleocapsídeo e proteínas de membrana (LENARD, 2008).

Dezessete coronavírus podem infectar humanos. Normalmente, essa infecção apresenta sintomas leves, como um resfriado comum. Porém, entre eles, três causam os mesmos sintomas, mas com maior intensidade e também são responsáveis por complicações de pneumonia atípica grave, o que aumenta sua mortalidade em comparação com outros vírus (CUI et al., 2019; LI et al., 2020).

Foi estabelecido que cepas de CoVs estivessem envolvidas na origem da síndrome respiratória aguda grave (SARS) de 2002, que se espalhou-se por 37 países afetando quase 8.500 indivíduos com 916 mortes (CHAN-YEUNG; XU, 2003) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), que em 2012 infectou 2.519 indivíduos de 27 países, com 866 mortes, segundo a OMS (SONG et al., 2019). No final de dezembro de 2019, um novo CoV foi identificado como a causa do surto de pneumonia atípica em Wuhan, China, denominado COVID-19 (HUI et al., 2020).

O mecanismo de interação do SARS-CoV-2 com as células humanas que ele invade é semelhante ao SARS-CoV. A primeira etapa da infecção por SARS-CoV-2 é o contato do vírus com a ECA2 da superfície celular. A ECA2 interage com o SARS-CoV-2 externo ligando-se ao domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína viral spike. Esse processo é seguido pela clivagem proteolítica da proteína spike, que permite a fusão às células, e a protease serina 2 transmembrana (TMPRSS2) é a protease responsável pela reação. Todo esse processo aumenta a atividade da desintegrina e da proteína 17 contendo o domínio da metaloproteinase (ADAM17), também chamada de fator de necrose tumoral- α convertase (TACE), que induz a liberação de ectodomínio de ECA2, auxiliando na internalização do vírus. Outras proteases participam do processo de entrada e replicação viral, como a catepsina L e Mpro, respectivamente (Huang et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020; BRAZ et al., 2020).

Em indivíduos sintomáticos, febre e tosse são os sintomas mais comumente relatados, embora dor de garganta, falta de ar, fadiga, perda de olfato e paladar, bem como envolvimento gastrointestinal também sejam frequentemente observados. Alguns pacientes desenvolvem sintomas mais graves como pneumonia grave, edema pulmonar, falência de múltiplos órgãos e muitos vão a óbito (MARGOLIN et al., 2020; CHEN et al., 2020).

O rápido aumento do número de pacientes infectados em todo o mundo levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar um estado de emergência de saúde global para coordenar os esforços científicos e médicos e desenvolver rapidamente uma cura para os pacientes (TON et al., 2020). Os agentes antivirais específicos aprovados, como remdesivir e favipiravir, não produzem uma cura completa. Outros medicamentos como cloroquina, hidroxicloroquina, azitromicina, estão em uso na clínica, embora não tenha eficácia comprovada e podem causar danos colaterais que se sobrepõem aos benefícios (LIU et al., 2020; ZOU et al., 2020)

Nesse cenário caótico, a triagem computacional e a docagem molecular (DM) são alternativas promissoras para encontrar um medicamento novo ou o reaproveitamento de drogas para tratar os sintomas de COVID-19 (SOUZA et al., 2020) e o nebivolol foi determinado como ligante nesse estudo de afinidade entre moléculas. É um medicamento usado para o tratamento de hipertensão, tem propriedades vasodilatadoras, tem um potencial antiinflamatório e antioxidante muito forte e foi observado que ele possui afinidade com proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. Levando tudo isso em consideração, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a afinidade de ligação do nebivolol a alguns alvos proteicos envolvidos na entrada e replicação viral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

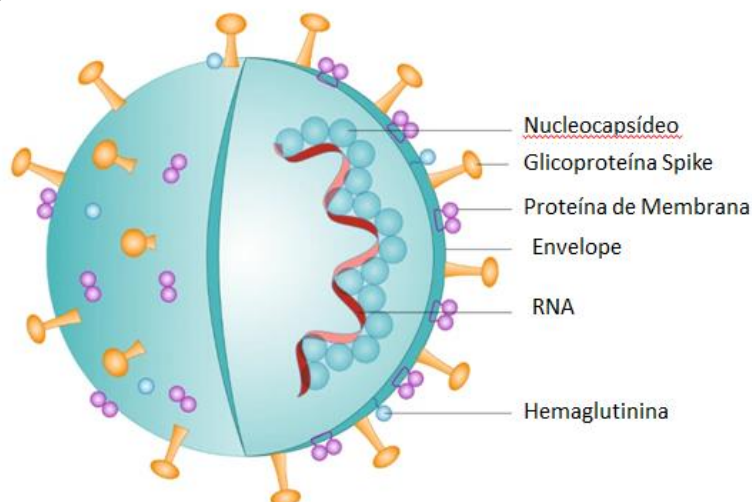
2.1 DOENÇA DO CORONAVÍRUS 19 (COVID 19)

Vários membros da família *Coronaviridae* circulam constantemente na população humana e geralmente causam doença respiratória leve (CORMAN et al., 2019). Em contraste, a síndrome respiratória aguda grave do coronavírus (SARS-CoV) e a síndrome respiratória do Oriente Médio coronavírus (MERS-CoV) são transmitidos de animais para humanos e causam doenças respiratórias graves em indivíduos afetados (FEHR et al., 2017).

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus (CoV) foi determinado como responsável por um surto de pneumonia atípica potencialmente fatal, definida como doença do coronavírus-19 (COVID-19), em Wuhan, na China, cuja a causa é a síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (FLORINDO et al., 2020), seu genoma compartilha cerca de 80% de identidade com o do SARS-CoV, responsável pela pandemia de SARS que ocorreu em 2002 e é cerca de 96% idêntico ao coronavírus de morcego BatCoV RaTG13 (ZHOU et al., 2020). Desde então, se espalhou globalmente, infectando milhões de pessoas em todo o mundo.

Os coronavírus são vírus com envelope que prendem o ácido ribonucleico (RNA) não segmentado, de sentido positivo e de fita simples. O tamanho do genoma varia de 26 a 32 kb, sendo o maior vírus de RNA conhecido. SARS-CoV-2 terminal 3' codifica proteínas estruturais, incluindo a glicoproteína de pico ou proteína S (LEUNG ET AL., 2004), de membrana (HE et al., 2005), envelope (SCHOEMAN, FIELDING, 2019) e nucleocapsídeo (LEUNG ET AL., 2004) (**Figura 1**).

Figura 1- Estrutura do novo coronavírus



Fonte: Adaptado de Florindo e colaboradores 2020.

Além dos genes que codificam proteínas estruturais, existem regiões genômicas específicas que codificam proteínas virais necessárias para a replicação (CUI et al., 2019), além de outras proteínas não estruturais, como a protease tipo papaína (PLpro) (BÁEZ-SANTOS et al., 2015) e protease principal do coronavírus (3CLpro ou Mpro) (ZIEBUHR et al., 2000).

2.2 MECANISMO DE ENTRADA DO VÍRUS NO HOSPEDEIRO

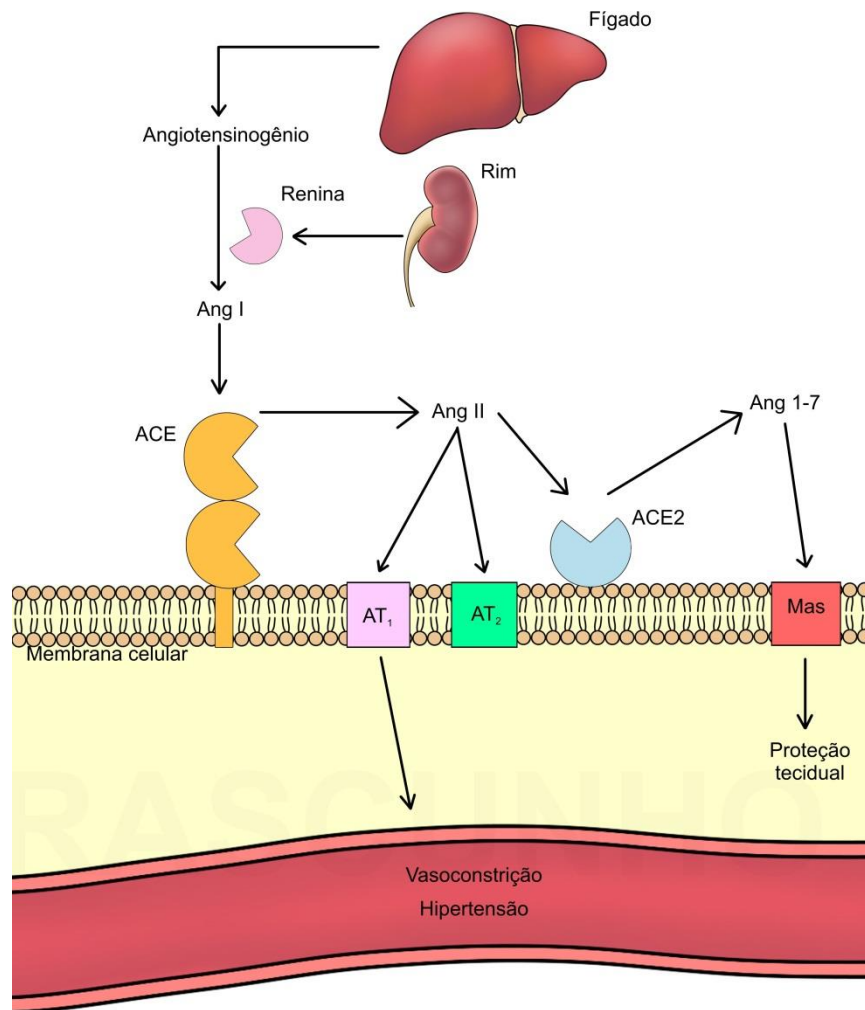
2.2.1 Enzima conversora de Angiotensina II (ECA2)

Estudos sobre o papel fisiológico da ECA2 começaram na década de 40 com Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949). Até então só havia evidências sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA), um componente chave do sistema renina-angiotensina (RAS), atuando na clivagem da angiotensina I em angiotensina II (SKEGGS JR; KAHN; SHUMWAY, 1956; NICOLAU; MAGALHÃES; VALE, 2020).

Anos depois, outros pesquisadores sugeriram que uma segunda carboxipeptidase, homóloga da enzima conversora da angiotensina seria responsável pela inativação da angiotensina II pela liberação de fenilalanina, diferindo da ECA no que diz respeito a clivagem de aminoácidos nas angiotensinas (LENTZ et al., 1956; TIPNIS et al., 2000; DONOGHUE et al., 2000; NICOLAU; MAGALHÃES; VALE, 2020).

Pesquisas recentes demonstram que o vírus SARS-CoV-2, assim como SARS-CoV, invade células-alvo por meio da interação de suas proteínas de pico com uma enzima chamada enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (HOFFMANN et al., 2020), tornando-se, portanto a porta de entrada do vírus. A ECA2, assim como a ECA fazem parte de um importante sistema de regulação, o sistema Renina Angiotensina (RAS) (**Figura 2**). Quando ocorre a infecção por SARS-COV-2, acontece um desequilíbrio entre ECA e ECA2. O sistema RAS é composto por dois eixos, o eixo ECA- Angiotensina II (Ang II)- Receptor tipo 1 (AT1R); e o eixo ECA2-Angiotensina 1 -2 (Ang 1 -7)- Receptor Mas. A combinação de Ang (1 -7) e receptor Mas antagoniza o eixo ACE-Ang II.- AT1R, e desempenha um papel na redução da pressão arterial através da vasodilatação, resistência ao estresse oxidativo e à proliferação celular (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000; CHEN; SPARKS et al.,2014).

Figura 2- Sistema renina angiotensina (RAS)



Fonte: Autoria própria, 2021.

A infecção por SARS-COV-2 reduz a conversão mediada por ECA2 de Ang II para Ang 1-7, que neutralizam os efeitos da Ang II gerado pela ECA (SRIRAM; INSEL, 2020). A ligação do SARS-COV-2 a ECA2 e a entrada viral tem sido correlacionada à diminuição dos níveis dessa enzima na superfície celular. A diminuição dos níveis de ECA2 já foi associada a doenças cardiovasculares, pulmonares e doenças do trato gastrointestinal, sintomas estes que são apresentados por pacientes infectados por SARS-CoV-2 (WANG; GHEBLAWI; OUDIT, 2020; KUSTER et al., 2020).

2.2.2 Outras proteases envolvidas na entrada viral

A entrada do CoV nas células hospedeiras é mediada por sua glicoproteína de pico transmembrana (S) que forma homotrímeros que se projetam da superfície viral formando a “coroa” que dá nome ao grupo (TORTORICI, VEESLER, 2019) e facilitam a entrada do vírus nas células-alvo (HOFFMANN et al., 2020). Os coronavírus usam essa glicoproteína de pico, composta de uma subunidade S1 e S2 em cada monômero de pico, para ligar os receptores da célula hospedeira (BELOUZARD et al., 2012). Este evento de ligação inicial desencadeia vários eventos que culminam com a fusão das membranas celulares e virais para a entrada na célula, como mostra a **figura 3** (SOROKINA et al., 2020)

Estudos recentes têm apontado o papel importante e conservado da ECA 2 na mediação da entrada do SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020). É conhecido que a proteína de pico do SARS-CoV-2 interage com ACE2 por meio de um domínio de ligação ao receptor (RBD), que se liga a ACE2 com baixa afinidade (TAI et al., 2020) e, em seguida, induz a dissociação de S1 com ACE2, levando o S2 a se transferir de uma pré-fusão para um estado pós-fusão essencial para a fusão da membrana. Portanto, a ligação da proteína spike ao domínio de ligação RBD da ECA2 é a primeira etapa-chave que permite que o vírus entre nas células alvo (SOROKINA et al., 2020).

Este processo é seguido pela clivagem proteolítica da proteína spike, que permite a fusão às células, e a protease serina 2 transmembrana (TMPRSS2) foi identificada como uma protease responsável pela reação (HOFFMANN et al., 2020). Estudos mostram a participação de uma protease catépsina L (CTSL) do hospedeiro na clivagem da proteína S, importante na liberação do vírus para o citosol (DEVAUX et al., 2020). Enquanto a serina protease TMPRSS2 atua localmente na membrana plasmática da célula hospedeira e possivelmente durante o tráfego de vesículas endocitóticas (GLOWACKA et al., 2011), CTSL continua a degradação da subunidade S1 no endossomo ácido e nos compartimentos do lisossoma (LIU et al., 2020).

No pulmão humano, as células epiteliais alveolares do tipo II coexpressam ACE2 e TMPRSS2 e são consideradas as principais responsáveis pela entrada do vírus em SARS e COVID-19 (HAMMING et al., 2004). Foi relatado recentemente que ACE2 e TMPRSS2 são altamente coexpressos em células epiteliais nasais e córneas. Os enterócitos também coexpressam ACE2 e TMPRSS2, e o SARS-CoV-2, bem como o SARS-CoV, infectam rapidamente os organoides do intestino delgado

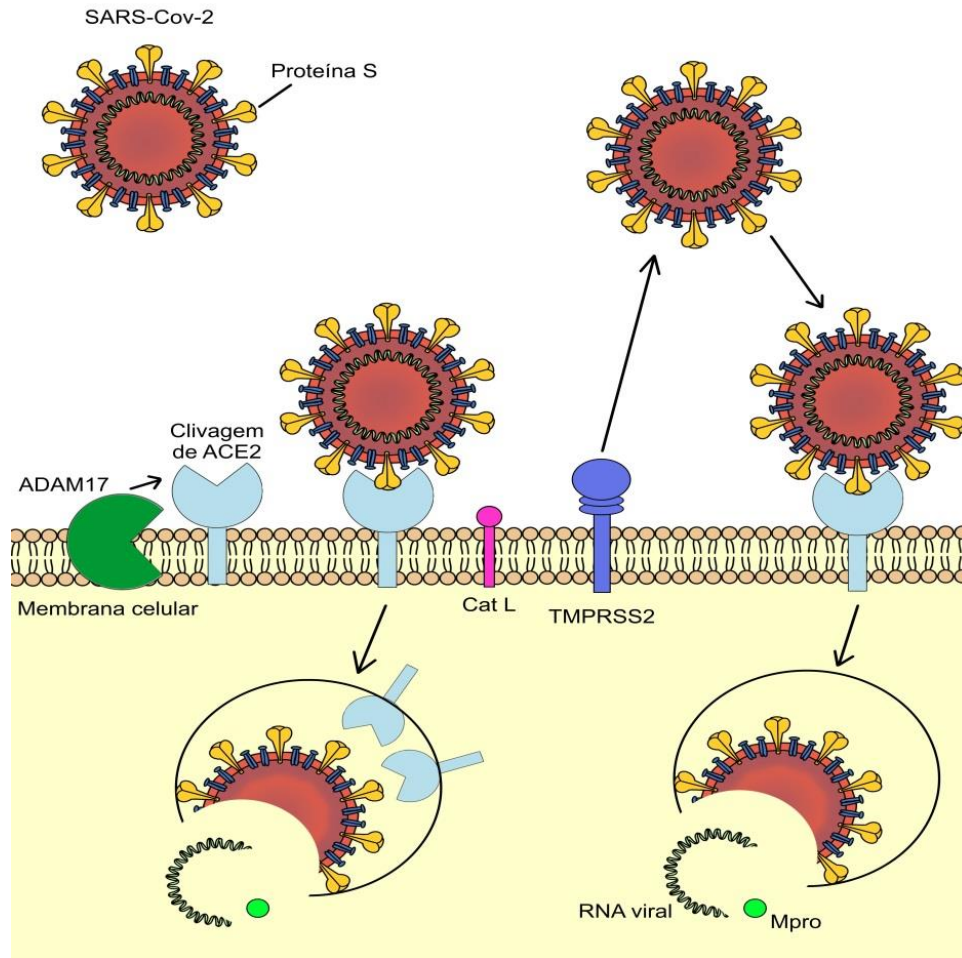
humano (SUNGNAK et al, 2020). Esses achados sugerem vias alternativas de entrada do vírus pelas vias aéreas superiores, olhos e órgãos intestinais (SHIBATA et al., 2020).

Um fator que tem sido associado à diminuição da expressão de ACE2 e a patogênese da COVID-19 é a superativação da ADAM metalopeptidase de domínio 17 (ADAM-17), também conhecida como enzima conversora de TNF-alfa (TACE). Essa enzima media a proteólise e o derramamento do ectodomínio de ACE2, favorecendo a diminuição da sua expressão na superfície celular e deslocamento do sistema RAS para o eixo ACE-AngII- AT1R e conseqüentemente o aparecimento de efeitos deletérios (BLACK et al., 1997; MOSS et al., 1997; GOOZ, 2010; FAN et al., 2015; PATEL et al., 2014; GHEBLAWI et al., 2020).

Levando em consideração que o esgotamento do ACE2 na superfície celular é um resultado patológico crítico da infecção pelo SARS-CoV-2, e que o ADAM 17 apresenta um papel essencial para o derramamento de ACE2, o bloqueio de ADAM17 pode vir a apresentar um papel importante na patogênese da COVID-19.

A protease principal Mpro, também conhecida como 3CLpro, é uma das proteínas não estruturais do coronavírus, ela cliva as poliproteínas virais, gerando 12 proteínas não estruturais (Nsp4-Nsp16), incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, Nsp12) e a helicase (Nsp13), importantes na replicação viral. A inibição de Mpro impediria a replicação do vírus e, portanto, constitui uma das estratégias anticonvirais potenciais (PILLAIYAR et al., 2016; RUT et al., 2021).

Figura 3- Mecanismo de entrada e replicação viral – principais proteínas



Fonte: Autoria própria, 2021.

2.3 SINTOMATOLOGIA E DADOS EPIDEMIOLÓGICOS







De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o período de incubação após a infecção é de 2 a 14 dias, com uma média estimada de 5,1 dias (LAUER et al., 2020; LI et al., 2020). No entanto, casos com incubação mais longa, também já foram relatados e podem ir até 24 dias (BAI et al., 2020). O longo período de incubação é a principal razão para a infecção em massa, visto que é geralmente assintomática, porém contagiosa (LI et al., 2020). Embora a média de idade estimada dos pacientes seja de aproximadamente 70 anos, todas as faixas etárias são suscetíveis a esse vírus. No entanto, a população idosa (> 60) e as pessoas com comorbidades têm maior probabilidade de desenvolver sintomas graves após a infecção (KLUGE, 2020).

Assim como CoVs anteriores, o SARS-CoV-2 está infectando predominantemente as vias aéreas inferiores, variando de doença respiratória leve a síndrome respiratória aguda grave e choque séptico em estágios avançados (CUI et al., 2019). Os sintomas mais relatados são febre, tosse seca, dispneia, fadiga, mialgia e anosmia que são características iniciais da manifestação mais frequente da infecção por SARS-CoV-2 (HUANG et al., 2020; BAIG et al., 2020; YANG et al., 2020). Médicos e patologistas também estão relatando danos devastadores ao sistema cardiovascular, intestino, rins e cérebro (SHI et al., 2020). De importância é a tendência recentemente observada de coagulação do sangue de pacientes com COVID-19, o que leva à constrição dos vasos e, por fim, pode resultar em embolia pulmonar ou acidente vascular cerebral isquêmico de grandes vasos, além de isquemia nos dedos das mãos e pés (OXLEY et al., 2020).

Normalmente, os óbitos são devido à comorbidades, como diabetes, hipertensão, doenças renais e hepáticas, asma etc.(LOVATO; DE FILIPPIS, 2020). A resposta inflamatória nos alvéolos do pulmão dificulta a troca gasosa, sugerindo que a morte em COVID-19 é devido à liberação aguda de mediadores inflamatórios e “tempestade de citocinas” uma condição caracterizada por uma ativação impressionantemente poderosa do sistema imunológico surgindo como um fator principal para um curso clínico mais grave (COPERCHINI et al., 2020).

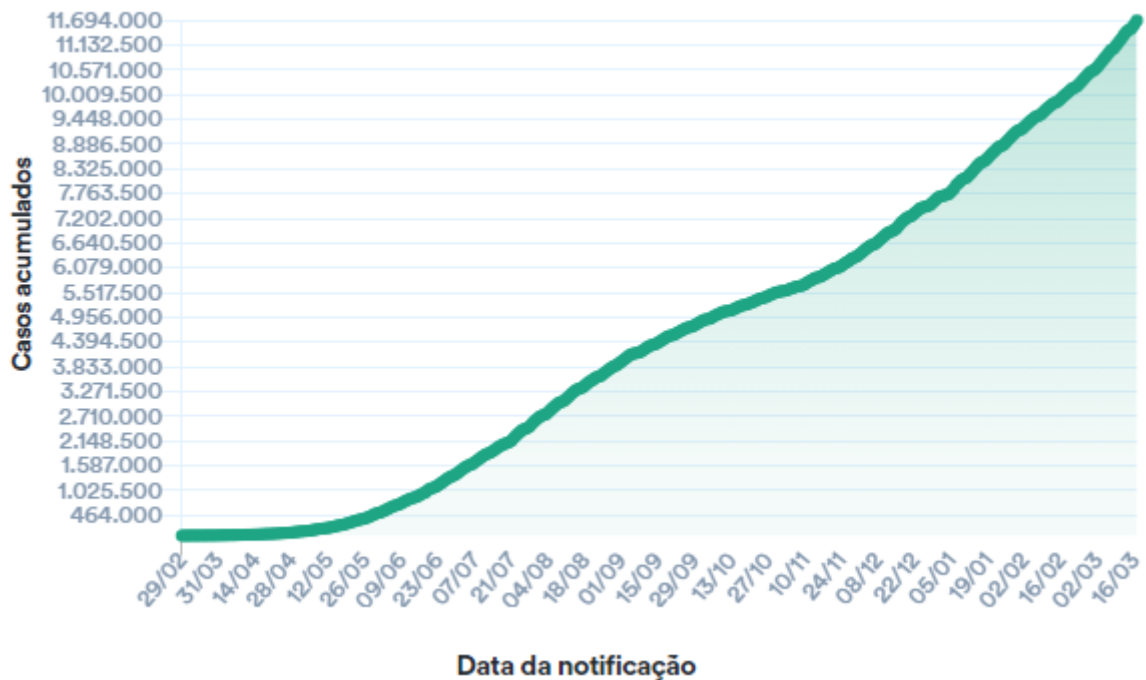
Segundo a OMS, os Estados Unidos ocupa o 1º lugar no ranking global dos países com maior número de casos acumulados, casos recentes e óbitos, seguido do Brasil e da Índia (**Figura 4**). O Brasil com quase 12 milhões de casos notificados até a data de 16 de março de 2021 (**Figura 5**).

Figura 4- Ranking dos países com maior número de casos e mortes - COVID 19

Nome	Casos - total cumulativo	⇅	Casos - relatados recentemente nas últimas 24 horas	Mortes - total cumulativo	Mortes - relatadas recentemente nas últimas 24 horas
Global	120.383.919		406.980	2.664.386	7,492
 Estados Unidos...	29.205.543 		49,651	530.815	701
 Brasil	11.519.609 		36,239	279,286	1.057
 Índia	11.438.734 		28,903	159.044	188

Fonte: Organização Mundial de Saúde (OMS)

Figura 5- Casos acumulados de COVID-19 por data de notificação



Fonte: Secretarias Estaduais de Saúde. Brasil, 2021.

2.4 OPÇÕES TERAPÊUTICAS

O reaproveitamento de medicamentos existentes apresenta uma estratégia de curto prazo viável para controlar a pandemia, especialmente considerando que alguns dos candidatos a medicamentos já estão disponíveis e têm um perfil de segurança estabelecido no organismo humano (GORDON et al., 2020), mas ainda é necessário ter atenção aos efeitos colaterais que desempenham um papel importante na seleção de métodos e reagentes terapêuticos (MARGOLIN et al., 2020).

Atualmente, dois tratamentos mostraram ter um efeito contra o novo coronavírus. O remdesivir, medicamento antiviral de amplo espectro, demonstrou encurtar o tempo de recuperação em adultos internados com COVID-19 grave (JACKSON et al., 2020). No entanto, o medicamento não reduziu a mortalidade. Em contraste, os dados iniciais do recente estudo Recovery (2020) no Reino Unido sugerem que doses diárias orais ou intravenosas de dexametasona (10 mg/10 dias) reduziram a mortalidade em um quinto em pacientes hospitalizados com COVID-19 e em um terço em pacientes que precisaram de ventilação mecânica. As reduções

na mortalidade foram observadas em pacientes cujos sintomas começaram 7 dias antes do recebimento do medicamento (MARGOLIN et al., 2020).

Os antimaláricos comumente disponíveis, cloroquina e hidroxicloroquina, estavam entre os primeiros a serem investigados. Os estudos iniciais foram pequenos e de fraca potência, alguns combinaram hidroxicloroquina com azitromicina (GAUTRET et al., 2020) e alguns se mostraram muito controversos em relação à sua conduta (MEHRA et al., 2020). Outra opção é a utilização de plasma convalescente de pacientes que se recuperaram recentemente de COVID-19. Pequenos estudos estão em andamento em alguns países, examinando sua utilidade como potencial profilaxia ou tratamento (DUAN et al., 2020).

A enzima conversora de angiotensina recombinante 2 (ACE2; APN01) que não possui a região transmembrana da proteína foi desenvolvida pela Apeiron Biologics para o tratamento de lesão pulmonar aguda e hipertensão arterial pulmonar. A ACE2 solúvel tem o potencial de reduzir a lesão pulmonar pela ativação do eixo do receptor antifibrótico e antiinflamatório da angiotensina (1-7)/MasR do sistema renina-angiotensina-aldosterona, agindo como isca, prevenindo a infecção por ligação ao vírus SARS-CoV-2 e inativando-o. APN01 está sendo testado em um estudo de fase I na China, e a aprovação foi garantida para a realização de estudos de fase II na Áustria, Alemanha e Dinamarca (NCT04335136) (MARGOLIN et al., 2020).

Atualmente, nenhum medicamento específico pode curar completamente a doença causada pelo SARS-CoV-2, tornando importante a busca mundial por alternativas que possam auxiliar no tratamento da COVID-19. Foi levantada a hipótese de que a intervenção farmacológica em um estágio inicial da infecção pode resultar em muito menos casos de indivíduos com COVID-19 grave devido à redução da entrada do vírus nas células. Consequentemente, elementos relacionados à estrutura e entrada do vírus na célula, constituem alvos atraentes para intervenção farmacológica para atingir este objetivo (YU et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

2.5 DOCAGEM MOLECULAR

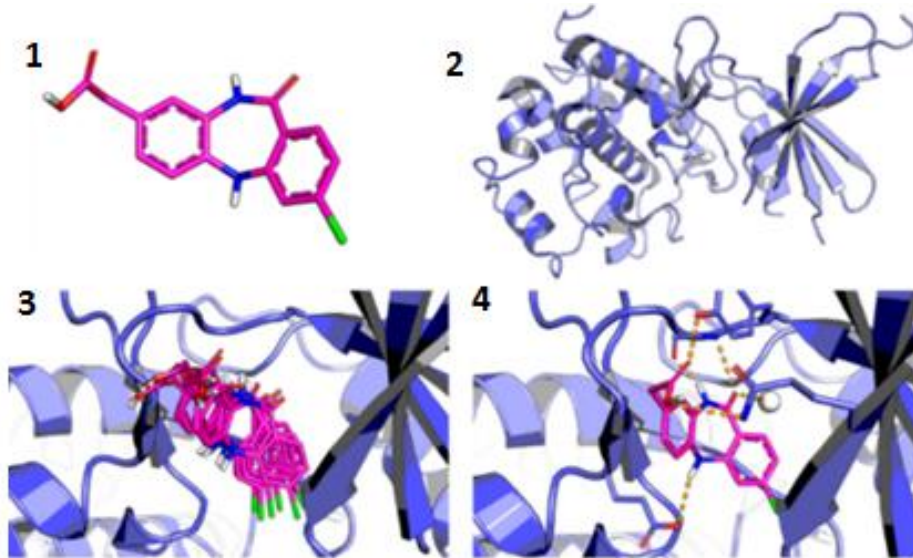
A indústria farmacêutica baseada em pesquisas tem empregado cada vez mais métodos modernos de química medicinal como ferramentas poderosas para o estudo das relações estrutura-atividade (HUGHES et al., 2011; FERREIRA et al.,

2015). Considerando os recentes desenvolvimentos em tecnologia de computador e o rápido aumento de dados estruturais, químicos e biológicos disponíveis em um número cada vez maior de alvos terapêuticos, é facilmente compreensível como o uso de abordagens *in silico* como quimioinformática, modelagem molecular e a inteligência artificial (IA) aumentou significativamente nas últimas décadas (MACALINO et al., 2015; PINZI, RASTELLI, 2019).

Diante disso, os métodos de desenho de drogas com base na estrutura (SBDD), ou seja, o uso de informações estruturais tridimensionais coletadas de alvos biológicos são um componente em destaque da química médica moderna (SALUM et al., 2008; FERREIRA et al., 2015). Docagem molecular, triagem virtual baseada em estrutura (SBVS) e dinâmica molecular (MD) estão entre as estratégias de SBDD mais frequentemente utilizadas devido à sua ampla gama de aplicações na análise de eventos de reconhecimento molecular, como energia de ligação, interações moleculares e mudanças conformacionais induzidas (KALYAANAMOORTHY, CHEN, 2011).

Docagem molecular é um dos métodos mais usados devido à sua capacidade de prever, com um grau substancial de precisão, a conformação de ligantes de moléculas pequenas dentro do local de ligação do alvo apropriado, como mostrado na **figura 6** (MENG et al., 2011). Após o desenvolvimento dos primeiros algoritmos na década de 1980, a docagem molecular tornou-se uma ferramenta essencial na descoberta de medicamentos (LÓPEZ-VALLEJO et al., 2011). Os algoritmos de acoplamento molecular executam previsões quantitativas de energia de ligação, fornecendo classificações de compostos acoplados com base na afinidade de ligação dos complexos ligante-receptor (LÓPEZ-VALLEJO et al., 2011; FERREIRA et al., 2015).

Figura 6- Interação entre ligante e o sítio ativo da proteína-alvo.



Fonte: Adaptado de Ferreira e colaboradores 2015

A identificação das conformações de ligação mais prováveis requer duas etapas: (1) exploração de um grande espaço conformacional representando vários modos de ligação potenciais; (2) previsão precisa da energia de interação associada a cada uma das conformações de ligação previstas (KAPETANOVIC, 2008). Os programas de docagem molecular realizam essas tarefas por meio de um processo cíclico, no qual a conformação do ligante é avaliada por funções de pontuação específicas. Este processo é realizado de forma recursiva até convergir para uma solução de energia mínima (KAPETANOVIC, 2008; FERREIRA et al., 2015). Os programas de docagem mais conhecidos são autodock 4.0, GOLD, flexX, DOCK, entre outros (SILVA, 2017).

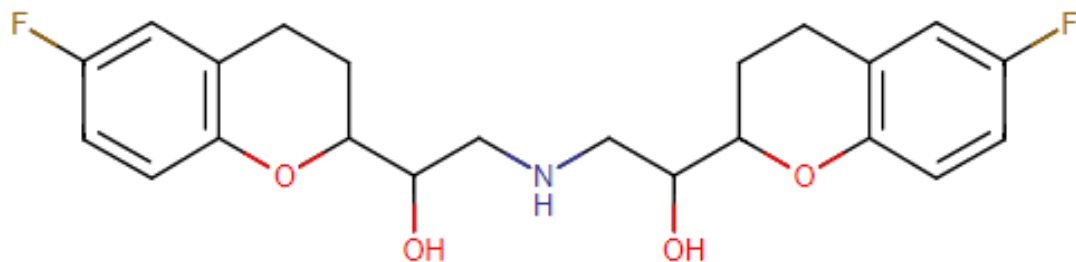
Em particular, o uso desta técnica tem se ampliado em direção a novos horizontes de descoberta de drogas, alimentado pelo aprimoramento de algoritmos de docagem e pelo aumento da informação publicamente acessível sobre ligantes e alvos. Por exemplo, graças à velocidade aprimorada e poder de previsão, a docagem molecular também foi incorporada em protocolos de triagem em grande escala para identificar (GLORIAM, 2019), por exemplo: (i) sítios de ligação de proteína em que ligantes poderiam se ligar (HAZARIKA et al., 2018); (ii) novos alvos moleculares de ligantes conhecidos (LI et al., 2006); (iii) potenciais reações adversas a medicamentos (RAMs) (LABUTE et al, 2014), e; (iv) ligantes com novos quimiotipos ativos contra um determinado alvo ou um conjunto de alvos desejados (LYU et al., 2019).

2.6 NEBIVOLOL

O nebivolol pertence ao grupo dos antagonistas beta-adrenoceptor de terceira geração que exibem bloqueio β_1 altamente seletivo e vasodilatação mediada por óxido nítrico (NO). A droga foi desenvolvida e patenteada na década de 1980 e entrou em uso médico na Europa em 1997 (MCNEELY, KAREN, 1999). No entanto, foi recentemente introduzida no mercado dos Estados Unidos após a aprovação do FDA para o tratamento da hipertensão em 2007 (WEHLAND et al., 2012).

A droga existe como enantiômeros L e D e possui a seguinte fórmula molecular: $C_{22}H_{25}F_2NO_4$. O D-nebivolol tem uma afinidade 175 vezes maior para os receptores β_1 do que o L-nebivolol e, portanto, é o principal responsável pelos efeitos cardíacos. Por outro lado, o L-nebivolol medeia principalmente a liberação de NO derivada do endotélio (**Figura 7**) (WEHLAND et al., 2012; OLAWI et al., 2019). Devido suas propriedades vasodilatadoras adicionais, os medicamentos de terceira geração (nebivolol, carvedilol, labetalol) oferecem um melhor perfil hemodinâmico juntamente com menos efeitos colaterais metabólicos desfavoráveis (WEHLAND et al., 2012; FISHER et al., 2015).

Figura 7- Estrutura química do nebivolol.



Fonte: PubChem.

A administração do nebivolol é por via oral e os pacientes podem tomá-lo independentemente dos alimentos, sendo metabolizado no fígado pelo sistema CYP 2D6 (PRIYADARSHNI; CURRY, 2020). O nebivolol é altamente seletivo para β_1 em doses ≤ 10 mg por dia, com afinidade aproximadamente 320 vezes maior para os receptores β_1 do que β_2 nas células do miocárdio humano (BRISTOW et al., 2005; FONGEMIE; FELIX-GETZIK, 2015).

O medicamento liga-se a 98% das proteínas, principalmente à albumina, e atinge o pico de concentração após 1,5–4 h. A meia-vida de eliminação é normalmente de 12 horas, mas é prolongada para 19 horas naqueles que são metabolizadores fracos. A excreção de nebivolol é de 35% pela urina e 44% pelas fezes nos metabolizadores médios; pacientes que são metabolizadores fracos excretam 67% da droga na urina e 13% nas fezes (FONGEMIE; FELIX-GETZIK, 2015).

Seu envolvimento no sistema nervoso simpático (SNS) e sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) é considerada uma contribuição para os casos de hipertensão. O bloqueio dos receptores beta-1 adrenérgicos pelo d-nebivolol leva à diminuição da frequência cardíaca em repouso, frequência cardíaca de exercício, contratilidade miocárdica, pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica (FONGEMIE, FELIX-GETZIK, 2015).

A seletividade do d-nebivolol limita a magnitude dos efeitos adversos do betabloqueador nas vias aéreas ou relacionados à sensibilidade à insulina. O nebivolol também inibe a aldosterona e o antagonismo de beta-1 no aparelho justaglomerular também inibe a liberação de renina. A diminuição da aldosterona leva à diminuição do volume sanguíneo e a diminuição da renina leva à redução da vasoconstrição (GILES et al., 2017). l-nebivolol é responsável pela atividade agonista do receptor beta-3 adrenérgico, que estimula a óxido nítrico sintase endotelial, aumentando os níveis de óxido nítrico; levando à vasodilatação, diminuição da resistência vascular periférica, aumento do volume sistólico, fração de ejeção e débito cardíaco (GIELEN et al., 2006; OLAWI et al., 2019)

Estudos mostraram que a monoterapia com nebivolol diminuiu a atividade da renina plasmática de maneira dependente da dose e isso é benéfico, visto que um aumento pode sinalizar um desfecho cardiovascular desfavorável (GILES et al., 2015). Ele também foi capaz de reduzir significativamente a frequência cardíaca e a resistência periférica e aumentou o volume sistólico, levando a um pequeno aumento no débito cardíaco em comparação com o atenolol (KAMP; SIESWERDA; VISSER, 2003; COATS; JAIN, 2017).

As melhorias na função diastólica também destacaram seu potencial para uso no tratamento da insuficiência cardíaca (PASINI et al., 2005). Há evidências que a agregação plaquetária mediada pelo NO *in vitro* e a proliferação de células musculares lisas são significativamente aumentadas pelo nebivolol, o que pode

contribuir para os efeitos cardioprotetores do nebivolol na isquemia miocárdica (MOEN; WAGSTAFF, 2006). O nebivolol também demonstrou reduzir a rigidez arterial, que é uma das principais causas de danos vasculares no cérebro (AGABITI-ROSEI; PORTERI; RIZZONI, 2009).

Além disso, reduz o nível de vários marcadores oxidativos e inflamatórios, como LDL oxidado, 8-isoprostanos, CRP, interleucina 6 (IL-6), adiponectina, leptina, molécula de adesão intercelular (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (MERCHANT et al., 2011; SERG et al., 2012). Um estudo *in silico* recente mostrou que o nebivolol interagiu com a interface de ligação entre proteínas não estruturais conservadas de SARS-CoV-2, Nsp12-Nsp8, podendo atuar no bloqueio do processo de replicação viral (MUTLU et al., 2020). Esses atributos sugerem uma utilidade ampla para o nebivolol no tratamento sintomas mais graves da COVID-19, bem como o envolvimento e interação do mesmo com algumas proteínas relacionadas ao vírus

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar *in silico* a afinidade do nebivolol a proteínas envolvidas na infecção por SARS-CoV-2, visando uma possível opção terapêutica contra a doença do coronavírus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os sítios ativos da proteína S aberta e fechada, ECA2, ADAM-17, domínio RBD, TMPRSS2, Catepsina L e Mpro;
- Preparar o ligante e as macromoléculas para o estudo de docagem molecular utilizando as estruturas 3D previamente obtidas;
- Analisar os resultados de energia de ligação adquiridos com a docagem molecular, verificando se houve uma boa interação entre o ligante e os alvos investigados, bem como os aminoácidos com os quais eles interagem.

4 METODOLOGIA

4.1 ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS (3D)

Para obtenção da estrutura 3D do Nebivolol, foi feito o download no banco de dados DrugBank. Os arquivos de estrutura 3D da proteína SARS-CoV-2 Spike (estado aberto e fechado), ACE2 humano, ADAM-17, domínio RBD, TMPRSS2, Catepsina L e Mpro foram baixados do *Protein Data Bank* (PDB) **Tabela 01**.

Tabela 01- Alvos testados, códigos PDB e coordenadas indicando o sítio ativo.

ALVOS MOLECULARES	CÓDIGO (PDB)	COORDENADAS
PROTEINA S FECHADA	6VXX	X - 184.902 Y - 196.081 Z - 224.564
PROTEINA S ABERTA	6VYB	X - 194.941 Y - 213.074 Z - 226.174
ECA 2	1R42	X - 54.614 Y - 54.855 Z - 32.161
DOMINIO RBD	6LZG	X - 103.744 Y - 0.268 Z - 51.608
ADAM 17	2DDF	X - 10.915 Y - 22.888 Z - 32.021
CATEPSINA L	2XU3	X - 21.701 Y - 9.696 Z - 16.185
Mpro	6Y2E	X - -15.874286 Y - -15.466714

		Z - 27.911143
TMPRSS2	2OQ5	X - -5.954 Y - 17.195 Z - 27.313

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.2 DETALHES COMPUTACIONAIS

Cálculos de otimização geométrica foram estudados usando o programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009) e realizados de acordo com o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (KOHN, SHAM, 1965) combinando a base B3LYP (LEE et al., 1998; BECKE, 1993) com 6-311++g** (MCLEAN; CHANDLER, 1980; RAGHAVACHARI et al., 1980). Cálculos de frequência foram feitos para obter propriedades termodinâmicas e verificar se cada otimização atingiu um mínimo de energia.

4.3 ENSAIOS DE DOCKING MOLECULAR (DM)

Os ensaios de docagem molecular foram realizados visando a ligação entre nebivolol (ligante) e as macromoléculas relacionadas ao SARS-CoV-2. Os cálculos de docagem molecular utilizaram o programa Autodock 4.2 (GOODSELL et al., 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS et al., 2008). As proteínas e o ligante foram preparados para docagem molecular utilizando o programa Autodock Tools (ADT), versão 1.5.6 (SANNER, 1999), seguindo um passo a passo previamente descrito. Os receptores foram considerados rígidos enquanto que o ligante foi flexível.

As cargas parciais Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de hidrogênio não polares de proteínas e do ligante foram posteriormente fundidos. Uma caixa cúbica de 60 × 60 × 60 pontos com espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foi gerada para o alvo de proteína inteira, determinando a posição do ligante nativo na conexão. O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) com busca global (MORRIS et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (SOLIS; WETS, 1981) foram os métodos aplicados na docagem molecular. Cada simulação consistiu em 100 execuções

independentes de simulações de acoplamento com os alvos para que o local de encaixe fosse bem definido. (RAMOS et al., 2012).

Outros parâmetros de encaixe foram estabelecidos como valores padrão. A capacidade de ligação do ligante e seus escores de afinidade de ligação correspondentes (ΔG) foram usados para determinar as melhores interações moleculares, bem como a interação entre resíduos de superfície (ROCHA et al., 2018).

4.4 ANÁLISE DA INTERFACE DOS COMPLEXOS

O banco de dados para análise estrutural de estruturas 3D PDB (EMBL - EBI) foi utilizado para analisar o conteúdo geral da região de interface resultante dos testes de docagem molecular. O software Ligplot foi usado para gerar as figuras 2D com as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas, e o software Pymol foi usado para gerar as figuras com estruturas 3D (LASKOWSKI et al., 2018). O software Pymol, além de ser utilizado para visualizar a estrutura molecular de modelos, também foi utilizado para identificar interações moleculares entre complexos, identificar interações polares e apolares e realizar o alinhamento de estruturas. O PyMol também foi utilizado para calcular o RMSD e gerar o escore para a sobreposição de estruturas (SOUZA et al., 2020).

5 RESULTADOS

5.1 DOCAGEM MOLEULAR

Os ensaios de docagem molecular foram realizados visando a ligação do neбиволол (ligante) com a Proteína S (aberta e fechada), Eca 2, Adam 17, TMPRSS2, Mpro, Catepsina L e domínio RDB (alvos), de acordo com o sítio ativo dos mesmos. As energias de ligação e as constantes de inibições obtidas foram determinadas a partir da capacidade de interação entre o complexo formado pelo ligante e os alvos, levando em consideração o número de corridas. Tais resultados estão presentes na **tabela 02**, listados em ordem decrescente de energia.

Tabela 02 – Resultados de energia de ligação, constante de inibição dos complexos.

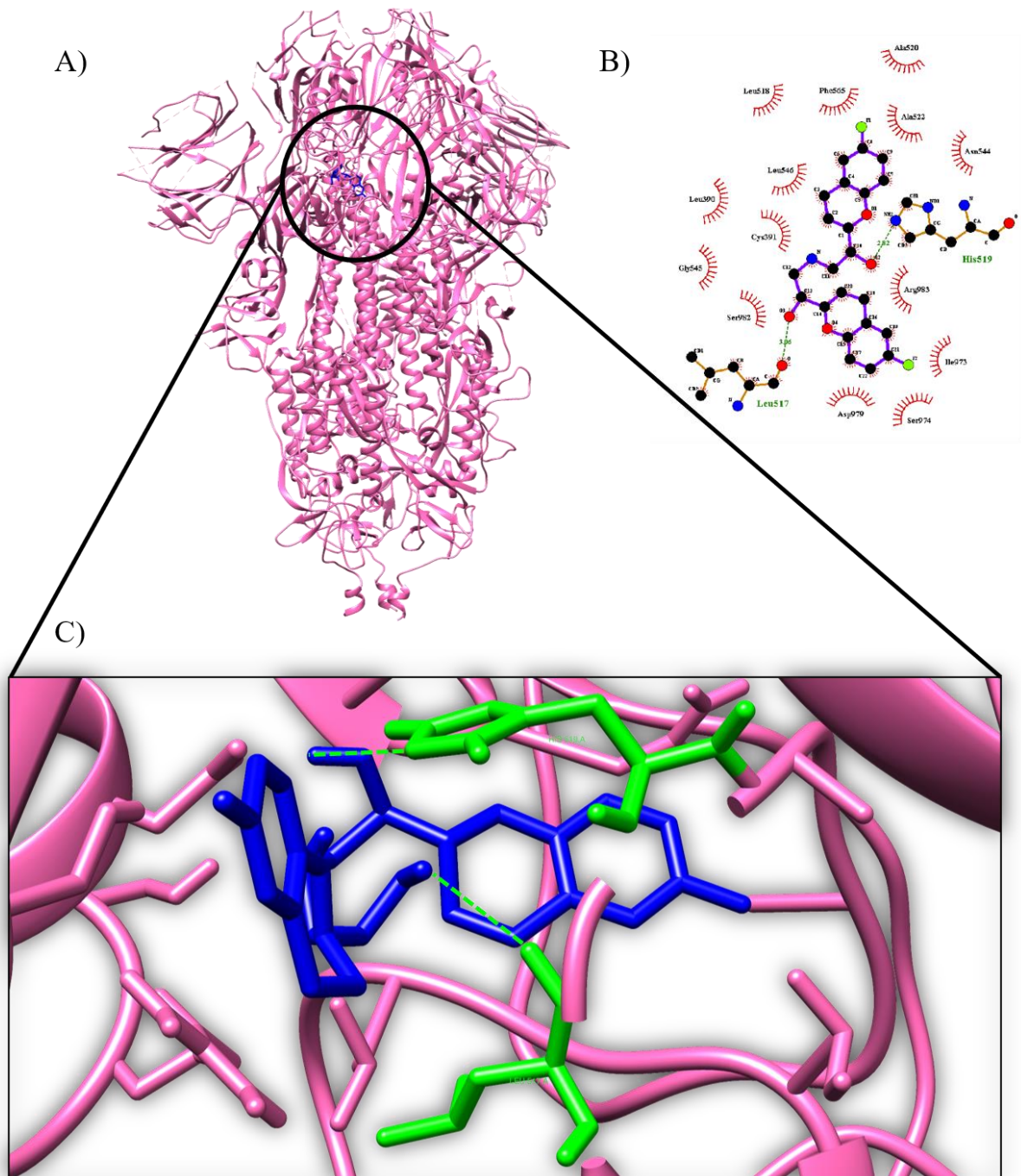
COMPLEXOS	ΔG_{bind} (kcal.mol ⁻¹)	Ki	Nº de execuções
NEB/PROTEINA S FECHADA	-9.48	112.16 nM	100
NEB/Mpro	-7.32	4.34 uM	100
NEB/PROTEINA S ABERTA	-7.06	6.64 uM	100
NEB/ADAM-17	-5.46	99.25 uM	100
NEB/CATEPSINA L	- 5.45	101.11 uM	100
NEB/TMPRSS2	-5.26	138.89 uM	100
NEB/DOMINIO RBD	-4.94	240.23 uM	100
NEB/ECA2	- 4.84	281.52 uM	100

Fonte: Autoria própria, 2021.

A análise de interação do complexo formado pelo neбиволол e a proteína S na conformação fechada (6VXX) foi realizada em três sítios ativos com coordenadas distintas, onde o melhor parâmetro de afinidade molecular foi atingido no 2º sítio ativo (X= 184.902 Y= 196.081 Z= 224.564), igual a -9,48 kcal.mol⁻¹ e uma constante de inibição de 112,16 nM. Na formação desse complexo foi observado duas interações por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Leu517 e His519 e

interações hidrofóbicas com Leu518, Leu546, Leu390, Cys391, Gly545, Ser982, Asp979, Ser974, Ile973, Arg983, Asn544, Ala522, Phe565 e Ala520 (**figura 8**).

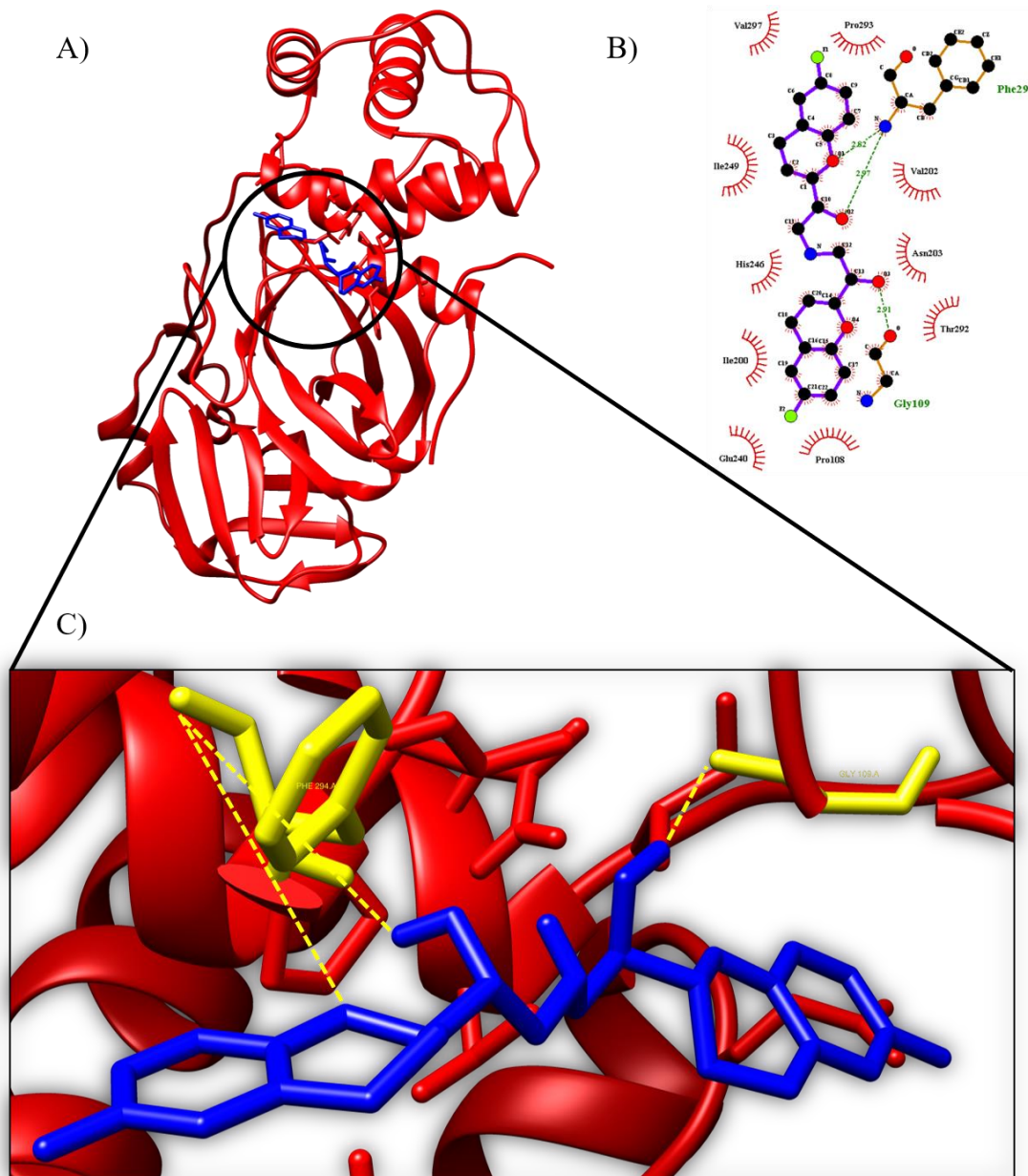
Figure 8 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/proteína S (6VXX 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



Fonte: Autoria própria, 2021.

Outro alvo estudado foi a proteína Mpro (6Y2E) que demonstrou energia de ligação igual a $-7,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e uma constante de inibição de $4,34 \text{ uM}$. A interação por pontes de hidrogênio foi observada com os aminoácidos Phe294 e Gly109 e ligações hidrofóbicas com Val202, Asn203, Thr292, Pro108, Glu240, Ile200, His246, Ile249, Val297 e Pro293 (**figura 9**). Esse complexo foi analisado em dois sítios ativos diferentes, porém o 2° sítio (X= - 15.874286 Y= - 15.466714 Z= 27.911143) obteve o melhor resultado, descrito acima.

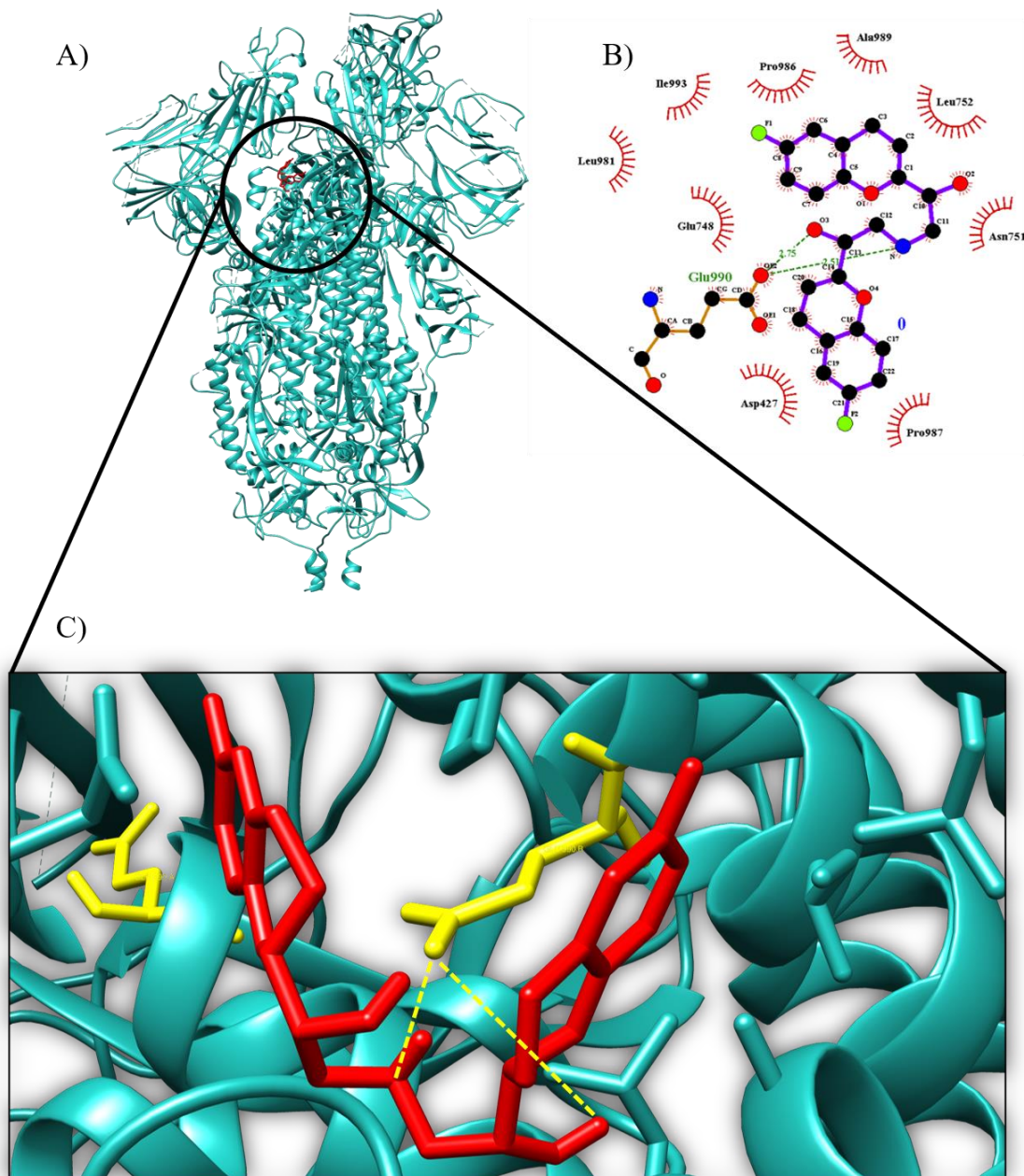
Figure 9 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/Mpro (6Y2E 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



Fonte:

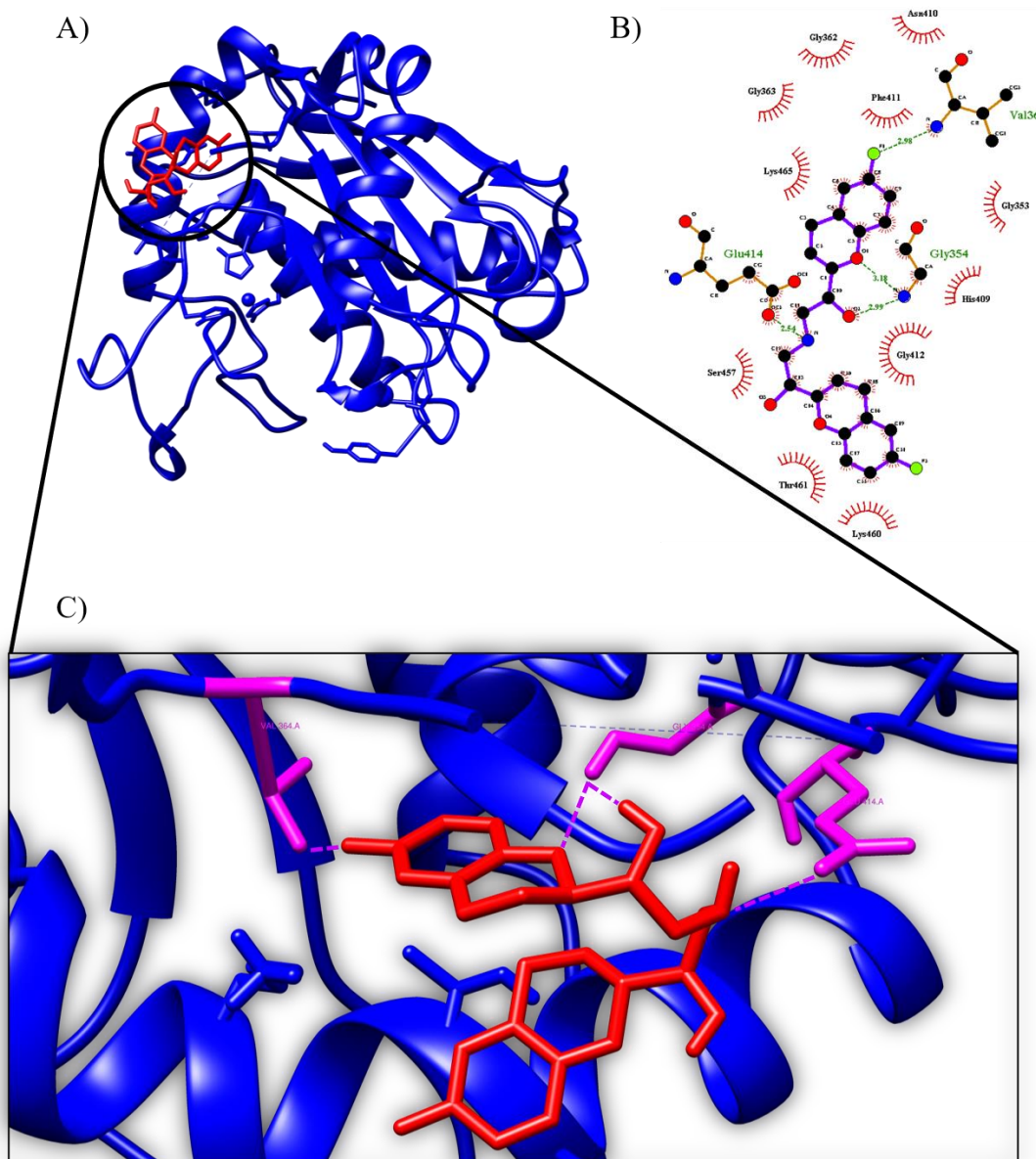
A interação da proteína S na conformação aberta (6VYB) com o ligante foi analisada em três sítios ativos, onde o melhor resultado obtido foi no 2° sítio ativo (X= 194.941 Y= 213.074 Z= 226.174) apresentando uma energia de ligação de $-7.06 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e $6.64 \text{ }\mu\text{M}$ de constante de inibição. Interagiu com Glu990 por pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas com Ala989, Leu752, Asn751, Pro987, Asp427, Glu748, Leu981, Ile993 e Pro986 (**Figura 10**).

Figure 10 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/proteína S (6VYB 2) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



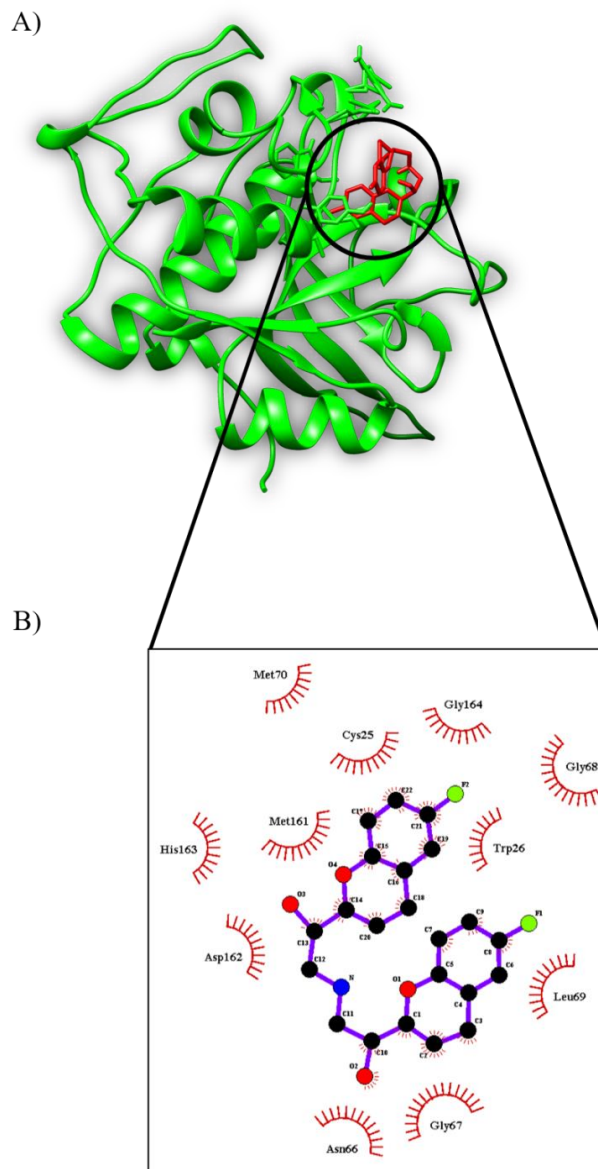
Os resultados mostraram que o neбиволol foi capaz de interagir com uma outra molécula estudada, o Adam-17 (2DDF). Nesse complexo foi observada uma energia de ligação de $-5,46 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $99,25 \text{ }\mu\text{M}$, interagindo assim com três aminoácidos por pontes de hidrogênio (Glu414, Gly354 e Val364) e com Asn410, Phe411, Gly362, Gly363, Lys465, Ser457, Thr461, Lys460, Gly412, His409 e Gly353 por ligações hidrofóbicas (**Figure 11**).

Figure 11 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/Adam-17 (2DDF) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



A catepsina L também foi analisada e os resultados mostraram que houve interação com o ligante. A análise de interação do complexo formado pelo neбиволol e a catepsina L (2XU3) foi realizada em dois sítios ativos distintos, e o melhor parâmetro de afinidade molecular foi atingido no 1° sítio ativo (X= 21.701 Y= 9.696 Z= 16.185), com energia de ligação igual a $-5,45 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de $101.11 \text{ }\mu\text{M}$. Com esses resultados, nenhuma interação por ponte de hidrogênio foi observada, porém houve interações hidrofóbicas com os seguintes aminoácidos: Met70, Cys25, Met161, His163, Asp162, Asn66, Gly67, Leu69, Trp26, Gly68 and Gly164 (**figura 12**).

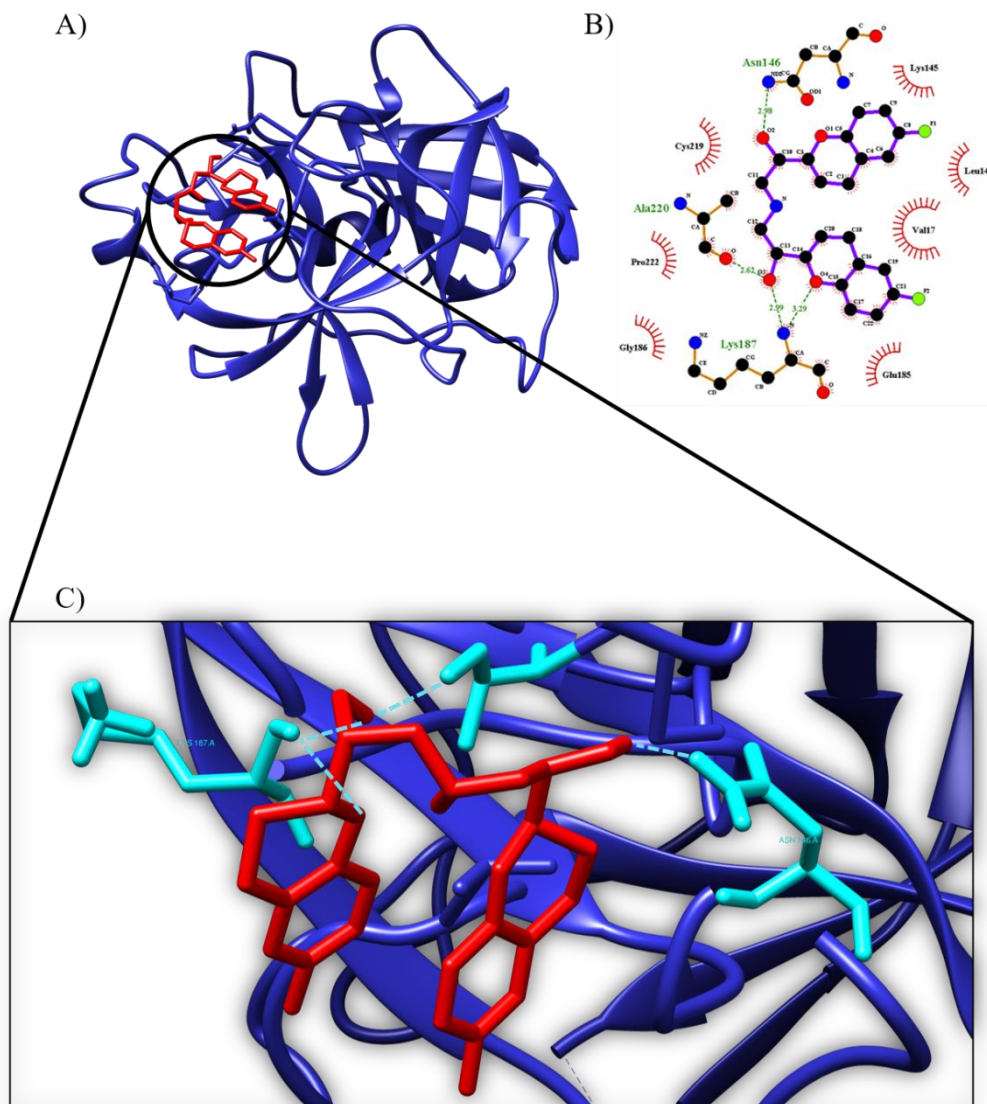
Figure 12 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/catepsina L (2XU3 1) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações hidrofóbicas (B)



Fonte: Autoria própria, 2021.

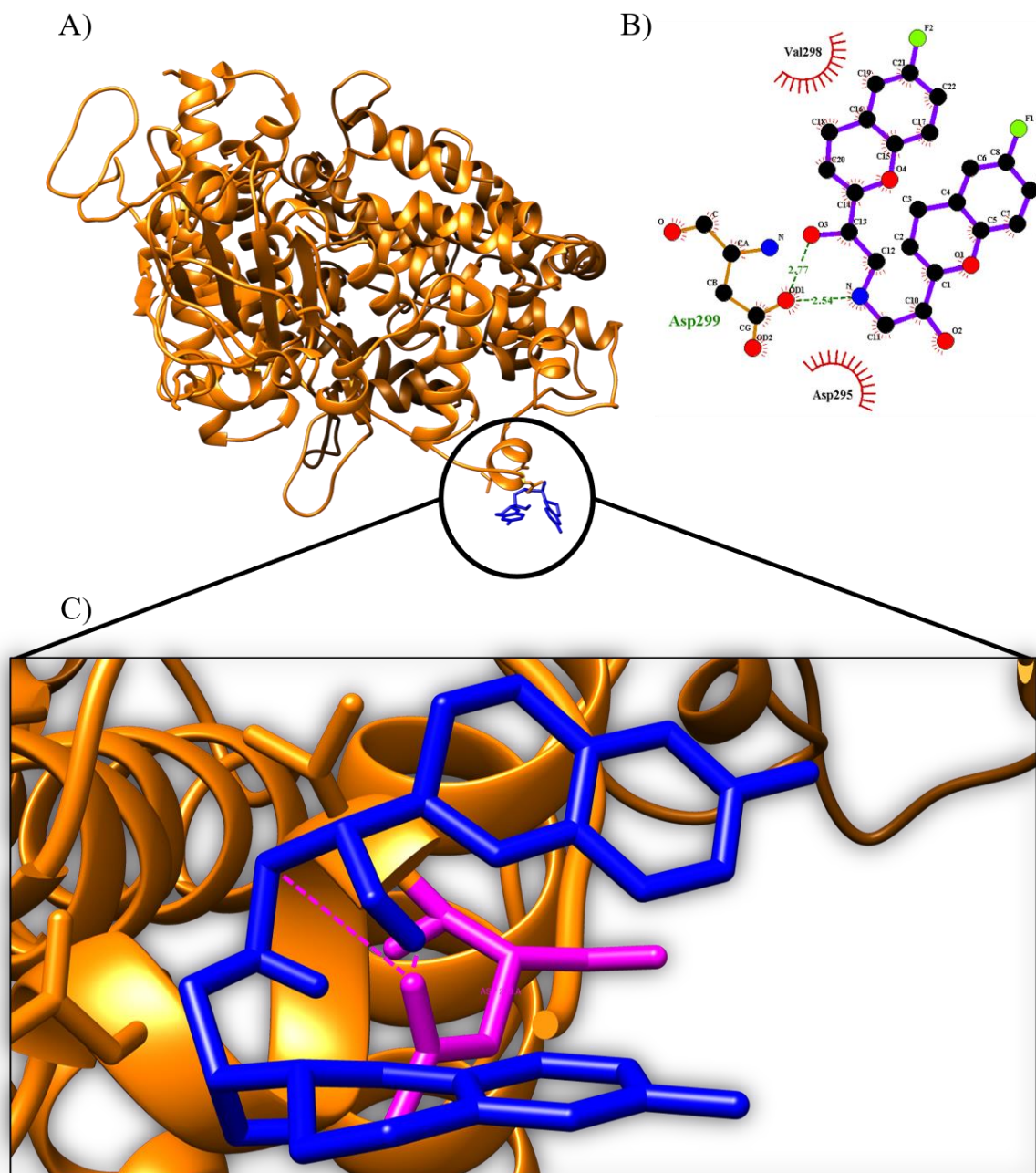
O complexo formado pelo nebivolol e TMPRSS2 (2OQ5) apresentou energia de ligação igual a $-5.26 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e uma constante de inibição de 138.89 nM. Na formação desse complexo foram observadas três interações por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Asn146, Ala220 e Lys187 e interações hidrofóbicas com Lys145, Leu144, Val17, Glu185, Gly186, Pro222 e Cys219 (**figura 13**). Dois sítios ativos diferentes foram analisados e o melhor resultado foi obtido no 1° sítio (X= -5.954 Y= 17.195 Z= 27.313).

Figure 13 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/TMPRSS2 (2OQ5 1) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



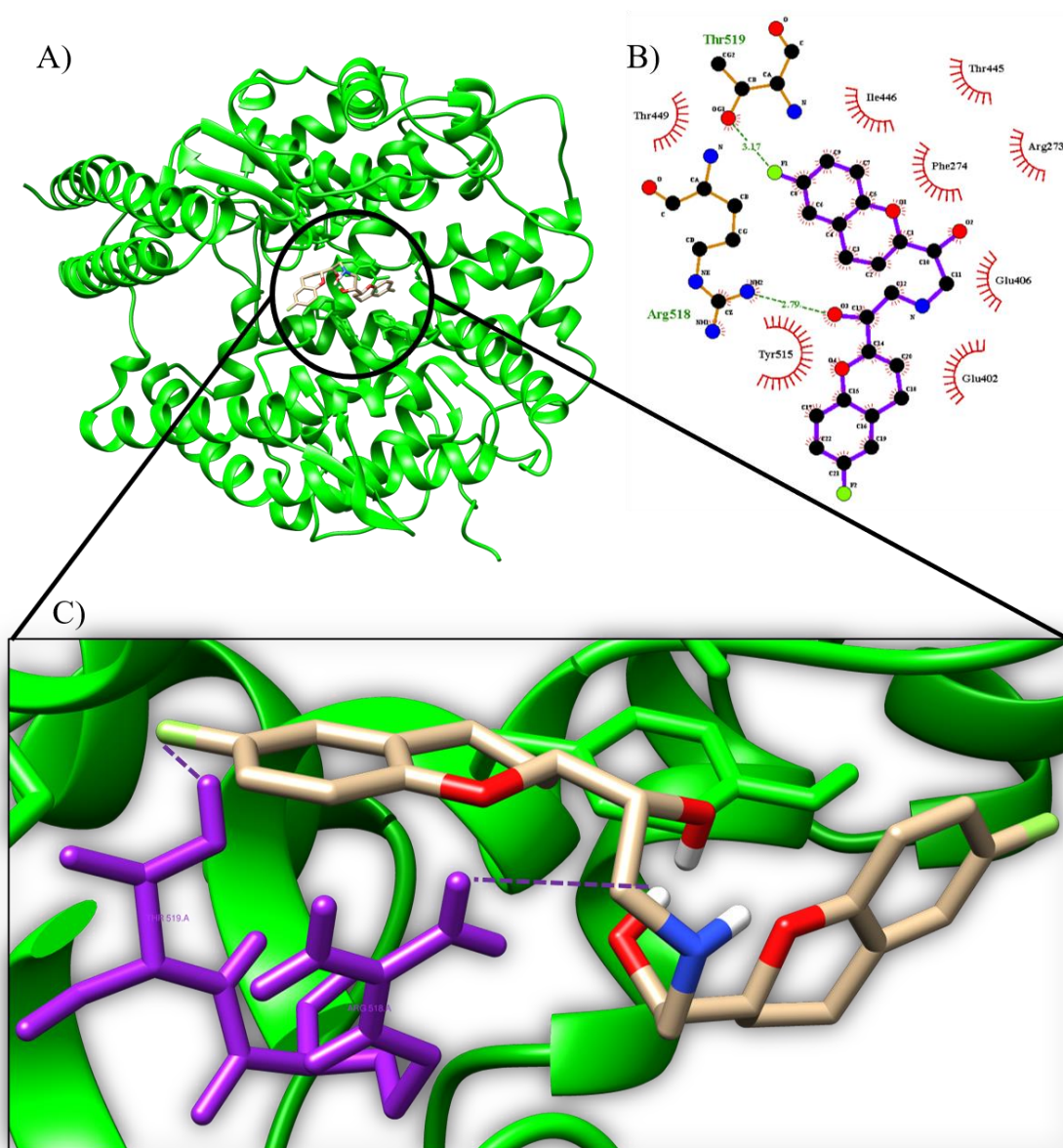
O domínio de Ligação do Receptor (RBD - 6LZG), assim como os demais, também mostrou interação satisfatória com o neбиволol. Nesse complexo foi observada uma energia de ligação de $-4.94 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $240.23 \text{ } \mu\text{M}$, interagindo com um aminoácido por ponte de hidrogênio (Asp299) e com Val298 e Asp295 por ligações hidrofóbicas (**Figure 14**).

Figure 14 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/RBD (6LZG) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



Assim como em todos os alvos testados, a ECA2 (1R42) também mostrou interação com o nebivolol, porém em uma energia considerada a menor entre as melhores. A energia de ligação foi de $-4.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e constante de inibição de 281.52 uM . Além disso, no complexo formado (nebivolol/ECA2), observou-se interação com os aminoácidos Thr519 e Arg518 por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com Thr449, Tyr515, Glu402, Glu406, Phe274, Arg273, Thr445 e Ile446 (**figura 15**)

Figure 15 – Docagem molecular 3D do complexo Nebivolol/ECA2 (1R42) ilustrando o sítio ativo de ligação (A) com as respectivas interações de ponte de hidrogênio (B e C).



6 DISCUSSÃO

Desde o final do ano de 2019, o mundo está enfrentando uma crise de saúde na forma de um novo surto de coronavírus que forçou todas as nações a enfrentar desafios como quarentena, mudança de rotina e tratamento de pessoas afetadas pelo vírus (CHIKHALE et al., 2020). Mesmo com a descoberta e distribuição das vacinas, alguns medicamentos estão sendo explorados e desenvolvidos para avaliação de possível ação contra o novo coronavírus (ANDRICOPULO, 2020).

Atualmente um dos métodos mais rápidos para a identificação de drogas potentes para COVID-19 tem sido o reposicionamento de drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA), visando enzimas essenciais para o ciclo de vida do SARS-CoV-2 e sua replicação (ZHOU et al., 2020). O reposicionamento de medicamentos diminui o custo da produção, reduz o tempo e também diminui o risco de falha, sendo crucial no atual cenário (PUSHPAKOM et al., 2019; SHARP; DANGE, 2020).

A eficácia de alguns medicamentos aprovados pelo FDA contra alguns coronavírus foi testada por meio de estudos *in silico*, que relataram o papel plausível de novas moléculas e reaproveitamento de drogas existentes no tratamento da COVID-19. Alguns estudos mostraram, por exemplo, que o reposicionamento de drogas como remdesivir e metilcobalamina foi sugerido como potenciais drogas inibitórias contra SARS-CoV-2, bem como a cloroquina e hidroxicloroquina (NARAYANAN; NAIR, 2020; MUTLU et al., 2020; BEURA; CHETTI, 2020).

O cloridrato de nebivolol (NEB) é um antagonista seletivo do receptor β_1 , com propriedades vasodilatadoras, usado para o tratamento de hipertensão (VENKATARAMAIAH et al., 2021). Além de seus efeitos benéficos sobre a pressão arterial, o nebivolol tem um potencial antiinflamatório e antioxidante bastante elevado, reduz o nível de vários marcadores oxidativos e inflamatórios em vários estudos clínicos (MERCHANT et al., 2011; PULLEN; COULSON; FENNING, 2014; HUSSAIN et al., 2017). Um estudo recente relatou que o nebivolol exibe atividade antiviral *in vitro* que são comparáveis ou melhores do que cloroquina e hidroxicloroquina, sugerindo que ele possa ser usado em combinação com outros medicamentos como o remdesivir (BOCCI et al., 2020). Mutlu e colaboradores (2020) mostraram em um estudo *in silico*, que o nebivolol interagiu na interface de ligação Nsp12-Nsp8, proteínas não estruturais importantes na replicação do genoma

viral do SARS-CoV-2. Diante disso, nosso estudo objetivou avaliar a afinidade de ligação do neбиволol com outros alvos considerados essenciais no processo de entrada e replicação do SARS-CoV-2 através de um estudo de docagem molecular.

O presente trabalho revelou que o neбиволol interage, mesmo que com energias de ligação diferentes, com todos os alvos testados. Um dos alvos analisados foi a proteína S, tanto na sua conformação fechada (6VXX) quanto na sua conformação aberta (6VYB). A proteína S possui duas subunidades funcionais, S1 e S2 e é utilizada para entrar na célula, a partir de sua ligação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), presente na membrana celular de alguns órgãos do hospedeiro (SHIBATA et al., 2020). Por conta disso, a proteína spike tem sido alvo de muitos estudos em todo o mundo, buscando formas de neutralizar a infecção por SARS-CoV-2, impedindo sua entrada na célula (SOUZA et al., 2020; WALLS et al., 2020).

O NEB mostrou melhor energia de ligação com a proteína spike em sua conformação fechada (6VXX), sendo esta de $-9,48 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e constante de inibição de $112,16 \text{ nM}$ (**figura 8**). A energia de ligação atingida no complexo NEB/proteína S aberta (6VYB) foi de $-7,06 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $6,64 \text{ }\mu\text{M}$ de constante de inibição (**figura 10**), tais resultados demonstram que o NEB tem capacidade de interação com a proteína de S nas duas conformações. Sabe-se que a cloroquina (CQ), a hidroxicloroquina (HCQ) (COLSON et al., 2020), o remdesivir (FREDIANSYAH et al., 2020), entre outros medicamentos estão sendo usados no tratamento de pacientes com Covid-19 e um estudo feito por Deshpande e colaboradores (2020), mostrou que a energia de ligação alcançada por esses três compostos com a proteína S foram de $-4,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $-5,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-6,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, respectivamente. Outro estudo feito por Abosheasha e El-gowily (2020) apresenta resultados referentes à ligação da HCQ à proteína S aberta, com energia de ligação igual a $-6,61 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e constante de inibição de $14,22 \text{ }\mu\text{M}$. Ao compararmos com nossos resultados, observou-se que o ligante, neбиволol, obteve maior energia de ligação com a proteína S do que os compostos anteriormente citados, atuando, portanto, no mecanismo de entrada do vírus, sugerindo que possa impedir ou bloquear sua ligação ao receptor humano e impedir a entrada viral.

Nossos resultados também mostraram a interação entre o NEB e a protease principal Mpro (6Y2E) que demonstrou energia de ligação igual a $-7,32 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e uma constante de inibição de $4,34 \text{ }\mu\text{M}$, sendo superior ao resultado obtido com a

proteína S aberta, ocupando a 2ª melhor energia de ligação do NEB (**figura 9**). A proteína não estrutural Mpro é uma das principais proteases de cisteína, importante na replicação de SARS-CoV-2 e bastante conservada do SARS-CoV (BÁEZ-SANTOS; JOHN; MESECAR, 2015). Assim, a inibição dessa protease pode prejudicar significativamente a maquinaria viral e a taxa geral de infecção viral (RAJPOOT; ALAGUMUTHU; BAIG, 2020).

Segundo um estudo realizado por Braz e colaboradores (2020) a HCQ apresentou uma energia de ligação a Mpro de $-6,5 \text{ kcal/mol}^{-1}$, e a CQ interagiu com alguns aminoácidos em comum com o NEB, como por exemplo, a Ile249, Phe294, Val297 e Pro293. Embora os medicamentos que já estão sendo usados na clínica e o NEB não atuem nos aminoácidos do sítio ativo da proteína, sugere-se que possam bloquear essa proteína através de outros mecanismos que precisam ser investigados.

Com relação as proteínas envolvidas na entrada viral, foi também avaliado o nível de interação entre o ligante e o ADAM-17 (2DDF), uma metalopeptidase de domínio 17, também conhecida como enzima conversora de TNF-alfa (TACE). Ela medeia a proteólise e o derramamento do ectodomínio de ACE2, favorecendo a diminuição da sua expressão na superfície celular, auxiliando na internalização do vírus (FAN et al., 2015; GHEBLAWI et al., 2020).

Haga e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína S do SARS-CoV induz a liberação de ACE2 por meio de um processo fortemente acoplado à produção de TNF- α , pelo ADAM-17 e que a regulação negativa de ACE2 estava associada a um desfecho clínico grave em casos de infecção por SARS-CoV. Além disso, TAPI-0, um inibidor do ADAM-17, impediu especificamente a entrada do vírus, trazendo a ideia de que a inibição dessa proteína é importante no bloqueio da entrada viral e sintomatologia.

Foi observado que o complexo NEB/ADAM-17 interagiu com uma energia de ligação de $-5,46 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $99,25 \mu\text{M}$, mostrando que há interação entre ligante/proteína e sugerindo uma possível inibição da mesma (**figura 11**).

A literatura relata que os aminoácidos Gly349, Leu348 e Glu406 são as partes essenciais do sítio ativo de TACE (ADAM-17) e um estudo desenvolvido por Murumkar et al (2015) mostrou que Diamidas à base de tartarato, inibidores seletivos de TACE atuam exatamente nos aminoácidos citados anteriormente. Outros

resultados desse mesmo estudo forneceram informações adicionais de que Pro437, Try436, Try433, Val440 e Val402 são resíduos essenciais do sítio ativo, porém o NEB interagiu com o ADAM-17 através de outros aminoácidos que não são semelhantes aos descritos. Portanto, sugere-se que o composto atue por um mecanismo diferente do que foi relatado.

A catepsina L (2XU3) desempenha um papel importante na entrada do vírus SARS-CoV-2, clivando a proteína S viral no endossomo ou lisossoma e posterior liberação de RNA viral, dependente de pH baixo (Shang et al., 2020; LIU et al., 2020). Estudos indicaram que inibidores da catepsina L, podem bloquear ou diminuir substancialmente a entrada do vírus (HOFFMANN et al., 2020; LIU et al., 2020). Mediante a isso resolvemos testar a Cat L a fim de analisarmos a interação dela com o neбиволol.

Segundo Braz et al (2020), a energia de ligação atingida pela CQ e HCQ é de -5,4 e -5,2 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos em nosso estudo, cuja energia de interação foi de -5,45 kcal.mol⁻¹ e uma constante de inibição de 101.11 μM (**figura 12**). Vivek-Ananth e colaboradores (2020) mostram que o E64-d, um inibidor de amplo espectro de proteases catepsinas incluindo a L, obteve uma energia de ligação de -5,0 kcal/mol⁻¹, resultado inferior à energia atingida em nosso estudo, sugerindo que o neбиволol possa atuar também como um inibidor dessa protease.

Os resíduos catalíticos da proteína são em Cys25 e His163 no subsítio S1, Asp162, Met161, Ala135, Met70 e Leu69 em o subsítio S2 e o resíduo conservado Gly68 no subsítio S3 da enzima (VIVEK-ANANTH et al., 2020). Nossos resultados mostram que o ligante interage com a proteína nos seguintes aminoácidos: Met70, Cys25, Met161, His163, Asp162, Asn66, Gly67, Leu69, Trp26, Gly68 e Gly164, demonstrando similaridade em alguns aminoácidos.

Na tentativa de avaliar se o ligante teria interação com mais alguma proteína responsável pela entrada viral, foi proposto a formação do complexo NEB/TMPRSS2. A TMPRSS2 é uma serina protease responsiva a andrógenos que cliva a proteína S do SARS-CoV-2, no sítio S1 e permite a fusão de membranas virais e celulares, um processo conduzido pela subunidade S2, facilitando a entrada, ativação viral e a inibição dessa protease é necessária para o bloqueio efetivo da internalização viral (STROPE; CHAU, 2020; HOFFMANN et al., 2020) (Hoffmann et al., 2020).

A TMPRSS2 compartilha uma dobra estrutural comum com uma tríade conservada de resíduos Ser441, His296 e Asp345 no sítio ativo para atividade catalítica (HU et al., 2020). Chikhale e colaboradores (2020) relataram que o mesilato de camostato, um inibidor conhecido de TMPRSS2, atingiu energia de ligação com a protease de $-6,23 \text{ kcal/mol}^{-1}$ interagindo com os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo. Nossos resultados mostraram que a energia de ligação do NEB com a protease foi de $-5.26 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e $138.89 \mu\text{M}$ de constante de inibição (**figura 13**), um valor próximo ao alcançado pelo inibidor anteriormente citado, porém não interagiu com nenhum aminoácido do sítio ativo, nos fazendo deduzir que o ligante pode estar inibindo a protease através de um mecanismo diferente do utilizado pelo mesilato de camostato.

O domínio de ligação ao receptor (RBD) (6LZG) está contido na subunidade S1 da glicoproteína de pico do coronavírus, que se liga ao domínio da peptidase (PD) da ACE2 da célula hospedeira (GYEBI et al., 2020) e desencadeia mudanças conformacionais em S2 para facilitar a fusão da membrana e a entrada na célula (SHANG et al., 2020). Portanto, o RBD torna-se um alvo provável para o desenvolvimento de vacinas, inibidores e anticorpos neutralizantes (TANG et al., 2020).

Segundo Braz e colaboradores (2020), a CQ e a HCQ obtiveram energia de ligação com o RBD de $-4,2$ e $-4,9 \text{ kcal/mol}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que em nosso estudo, a energia de ligação foi de $-4.94 \text{ kcal/mol}^{-1}$ e constante de inibição igual a $240.23 \mu\text{M}$ (**figura 14**), resultado superior a CQ e similar a HCQ. Liu e colaboradores (2020) mostrou que o aminoácido Met82 no receptor humano pode interagir com a posição Leu472 de RBD, o resíduo Thr487 em RBD liga-se a Tyr41 e Lys353 em ACE2 humano por contatos de van der Waals e treonina na posição 487 aumentou a afinidade da maioria dos RBDs para ACE2 humano. O complexo NEB/RBD não interagiu em nenhum desses aminoácidos, mas obteve uma energia de ligação que nos sugere que o ligante esteja atuando sobre o domínio, impedindo a ligação a ECA2.

O SARS-CoV-2 utiliza a ACE2 como uma porta para infectar células epiteliais no hospedeiro, por ligação da glicoproteína de pico (S) (ABOSHEASHA; EL-GOWILY, 2020). Atualmente, aparece como um alvo farmacológico promissor e a inibição dessa interação pode ser uma estratégia válida para o tratamento de pacientes com COVID-19 (RAGIA; MANOLOPOULOS, 2020). Além disso, a ACE2

possui função biológica importante no sistema RAS, podendo clivar a angiotensina II para produzir angiotensina 1–7 e clivar a angiotensina I para gerar angiotensina 1–9, produzindo efeitos protetores ao organismo (FERRARIO, 2006; OCARANZA et al., 2020).

Os resultados de nosso estudo mostraram que o nebivolol interage com a ECA2 numa energia de ligação de $-4.84 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e constante de inibição de 281.52 Um (**figura 15**). Um recente estudo mostrou resultados em que a CQ apresentou pontuações de afinidade de $-4,2 \text{ kcal/mol}^{-1}$, inferior ao resultado obtido com o nebivolol. Em contrapartida a HCQ apresentou uma energia de ligação de $-8,5 \text{ kcal/mol}^{-1}$, superior ao nosso resultado (BRAZ et al., 2020).

Os aminoácidos do sítio ativo da ECA2 são: Pro426, Ile439, Leu440 e Glu442 (PAL et al., 2020). O NEB interagiu em Thr519 e Arg518 por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas com Thr449, Tyr515, Glu402, Glu406, Phe274, Arg273, Thr445 e Ile446, ou seja, em nenhum aminoácido do sítio ativo. Concluímos, portanto, que a ação do ligante seja por outro mecanismo não elucidado.

Uma hipótese levantada por Nicolau; Magalhães; Vale (2020) defendeu que o evento-chave na COVID-19 pode ser a interrupção da degradação de Ang II devido uma regulação negativa de ECA2, que gera um aumento de níveis de angiotensina II e uma produção diminuída de angiotensina 1-7. A ligação de Ang II em direção ao receptor AT1, leva a mecanismos de lesão pró-inflamatória e cardiovascular, que podem contribuir para um dano tecidual (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010). Por ser um betabloqueador β_1 seletivo, o nebivolol age bloqueando a produção de renina nas células justaglomerulares do rim e conseqüentemente na síntese de Ang II proveniente da clivagem de Ang I, devido a cascata de acontecimentos que são interrompidos no sistema RAS (ATLAS, 2007; GILES et al., 2015).

Nossos resultados sugerem que o nebivolol pode agir na fase inicial da infecção, devido sua interação molecular com todos os alvos testados, mas por outro lado, seu uso terapêutico pode ser de grande valia no que muitos pesquisadores e profissionais de saúde chamam de Síndrome da COVID crônica ou *long covid* (BAIG, 2020), no qual alguns pacientes vêm relatando persistência dos sintomas da COVID-19 mesmo após meses de infecção, inclusive indivíduos que tiveram casos leves. Entre os sintomas mais frequentes observados estão, além da perda de olfato e paladar, dores musculares e nas articulações, fadiga, taquicardia, hipertensão ou

hipotensão e lesões pulmonares sem causa determinada (PERES, 2020; RUBIN, 2020).

Algumas atribuições do nebivolol podem favorecer seu uso na síndrome da COVID crônica, principalmente no que diz respeito a dano cardiovascular, como mostram alguns estudos onde o nebivolol conseguiu atenuar a proporção de neutrófilos, um marcador de inflamação vascular, em pacientes hipertensos (HUSSAIN et al., 2017), como também demonstrou significativa redução de agregação plaquetária em ratos diabéticos (TOBLLI et al., 2010) e melhoramento da disfunção diastólica e a remodelação miocárdica por meio da redução do estresse oxidativo (MA et al., 2012).

Alguns trabalhos vêm mostrando que o NEB melhora o fluxo sanguíneo coronário e periférico em pacientes com angina, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca crônica além disso, é um agente eficaz e bem tolerado com benefícios superiores aos dos β -bloqueadores tradicionais devido à sua influência na liberação de óxido nítrico, o que lhe confere efeitos hemodinâmicos singulares e um bom perfil de tolerabilidade (TOBLLI et al., 2012; FONGEMIE; FELIX-GETZIK, 2015). Portanto, acredita-se que ele possa trazer benefícios tanto no processo de internalização do vírus, quanto nos sintomas posteriores à infecção.

7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo demonstram que o nebivolol expressou afinidade de ligação com todos os alvos testados, apresentando as melhores energias de ligação com a proteína S no estado fechado (6VXX) e com a Mpro (6Y2E), indicando, portanto que o ligante pode atuar em diversas etapas da entrada e replicação viral, se configurando como uma boa opção terapêutica contra a COVID-19.

Ademais, o nebivolol apresentou energias de ligação semelhantes ou superiores a determinados fármacos que estão disponíveis no tratamento da COVID-19 e a inibidores de algumas proteases. Hipóteses foram levantadas nesse estudo referentes a mecanismos de atuação do nebivolol frente às proteínas analisadas, porém estudos futuros são necessários para confirmá-las.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizar um estudo de dinâmica molecular para confirmar os achados referentes ao complexo formado por NEB/proteína S fechada (6VXX), visto que apresentou a melhor energia de ligação; bem como análises *in vitro* e *in vivo* para confirmação de sua propriedade anti-SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

ABOSHEASHA, Mohammed A.; EL-GOWILY, Afnan H. Superiority of cilostazol among antiplatelet FDA-approved drugs against COVID 19 Mpro and spike protein: Drug repurposing approach. **Drug development research**, 2020.

AGABITI-ROSEI, Enrico; PORTERI, Enzo; RIZZONI, Damiano. Arterial stiffness, hypertension, and rational use of nebivolol. **Vascular health and risk management**, v. 5, p. 353, 2009.

ANDRICOPULO, Adriano D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 100, p. 7-27, 2020.

ATLAS, Steven A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **Journal of managed care pharmacy**, v. 13, n. 8 Supp B, p. 9-20, 2007.

BABY, Krishnaprasad et al. SARS-CoV-2 entry inhibitors by dual targeting TMPRSS2 and ACE2: An in silico drug repurposing study. **European journal of pharmacology**, v. 896, p. 173922, 2021.

BÁEZ-SANTOS, Y. M.; JOHN, S. E. St; MESECAR, A. D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. **Antiviral research**, v. 115, p. 21-38, 2015.

BAI, Y. et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19. **Jama**, v. 323, n. 14, p. 1406-1407, 2020.

BAIG, Abdul Mannan. Chronic COVID Syndrome: Need for an appropriate medical terminology for Long-COVID and COVID Long-Haulers. **Journal of medical virology**, 2020.

BAIG, AM. et al. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. **ACS chemical neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 995-998, 2020.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry.III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, p. 5648-5652, 1993.

BELOUZARD, S. *et al.* Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011-1033, 2012.

BENIGNI, Ariela; CASSIS, Paola; REMUZZI, Giuseppe. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.

BEURA, Satyajit; CHETTI, Prabhakar. In-silico strategies for probing chloroquine based inhibitors against SARS-CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-13, 2020.

BLACK, Roy A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997.

BOCCI, Giovanni et al. Virtual and In Vitro Antiviral Screening Revive Therapeutic Drugs for COVID-19. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 3, n. 6, p. 1278-1292, 2020.

BOOPATHI, S.; POMA, A. B.; KOLANDAIVEL, P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-10, 2020.

BRAZ, Helyson Lucas Bezerra et al. In silico study of azithromycin, chloroquine and hydroxychloroquine and their potential mechanisms of action against SARS-CoV-2 infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 3, p. 106119, 2020.

BRISTOW, Michael R. et al. P-121: characterization of [beta] 1-adrenergic receptor selectivity of nebivolol and various other beta-blockers in human myocardium. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. S4, p. 51A, 2005.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia. Resumo do composto PubChem para CID 71301, Nebivolol. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nebivolol> >. Acesso em: 3 de outubro de 2020.

CHANDEL, Vaishali et al. Structure-based drug repurposing for targeting Nsp9 replicase and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-14, 2020.

CHAN-YEUNG, M.; XU, R. H. SARS: Epidemiology. **Respirology** 8: S9–S14. 2003.

CHEN, Nanshan et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.

CHIKHALE, Rupesh V. et al. Identification of potential anti-TMPRSS2 natural products through homology modelling, virtual screening and molecular dynamics simulation studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-16, 2020.

COATS, A.; JAIN, S. Protective effects of nebivolol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage. **Journal of human hypertension**, v. 31, n. 6, p. 376-381, 2017.

COLSON, Philippe et al. Chloroquine and hydroxychloroquine as available weapons to fight COVID-19. **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, n. 4, p. 105932, 2020.

COPERCHINI, Francesca et al. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 53, p. 25-32, 2020.

CORMAN, V. M.; LIENAU, J.; WITZENRATH, M. Coronaviruses as the cause of respiratory infections. **Der Internist**, v. 60, n. 11, p. 1136-1145, 2019.

CORONAVIRUS BRASIL. Painel coronavirus. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 16 de março de 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

CZURIGA, I., *et al.* "Comparison of the new cardioselective beta-blocker nebivolol with bisoprolol in hypertension: the Nebivolol, Bisoprolol Multicenter Study (NEBIS)." **Cardiovascular drugs and therapy** 17.3 (2003): 257-263.

DESHPANDE, Rujuta R. *et al.* In silico molecular docking analysis for repurposing therapeutics against multiple proteins from SARS-CoV-2. **European Journal of Pharmacology**, v. 886, p. 173430, 2020.

DEVAUX, C. A. *et al.* New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19?. **International journal of antimicrobial agents**, p. 105938, 2020.

DONOGHUE, Mary *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation research**, v. 87, n. 5, p. e1-e9, 2000.

DUAN, K. *et al.* Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 17, p. 9490-9496, 2020.

FAN, D. *et al.* Cardiomyocyte A Disintegrin And Metalloproteinase 17 (ADAM17) Is Essential in Post–Myocardial Infarction Repair by Regulating Angiogenesis. **Circulation: Heart Failure**, v. 8, n. 5, p. 970-979, 2015.

FEHR, A. R.; CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Middle East respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus. **Annual review of medicine**, v. 68, 2017.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: **Coronaviruses**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 1-23.

FERRARIO, Carlos M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease—therapeutic implications of more than a century of research. **Journal of the Renin-angiotensin-aldosterone System**, v. 7, n. 1, p. 3-14, 2006.

FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FISKER, F. Y.; DANIELA G.; MARKUS W. "Third-generation beta-adrenoceptor antagonists in the treatment of hypertension and heart failure." **Basic & clinical pharmacology & toxicology** 117.1 (2015): 5-14.

FLORINDO, H. F. *et al.* Immune-mediated approaches against COVID-19. **Nature nanotechnology**, p. 1-16, 2020.

FONGEMIE, Justin; FELIX-GETZIK, Erika. A review of nebivolol pharmacology and clinical evidence. **Drugs**, v. 75, n. 12, p. 1349-1371, 2015.

FREDIANSYAH, Andri et al. Remdesivir and its antiviral activity against COVID-19: A systematic review. **Clinical epidemiology and global health**, 2020.

FRISCH, M. J. *et al.* **Gaussian 09 revision D.01**, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity da rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v, 36, p. 3219-3228, 1980.

GAUTRET, P. *et al.* Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International journal of antimicrobial agents**, p. 105949, 2020.

GHEBLAWI, M. et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. **Circulation research**, v. 126, n. 10, p. 1456- 1474, 2020.

GIELEN, W.; CLEOPHAS, T. J.; AGRAWAL, R. Nebivolol: a review of its clinical and pharmacological characteristics. **International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 44, n. 8, 2006.

GILES, T. D. *et al.* Rationale for nebivolol/valsartan combination for hypertension: review of preclinical and clinical data. **Journal of hypertension**, v. 35, n. 9, p. 1758, 2017.

GILES, Thomas D. et al. Correlations of plasma renin activity and aldosterone concentration with ambulatory blood pressure responses to nebivolol and valsartan, alone and in combination, in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 9, n. 11, p. 845-854, 2015.

GLORIAM, D. E. Bigger is better in virtual drug screens. 2019.

GLOWACKA, Ilona et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. **Journal of virology**, v. 85, n. 9, p. 4122-4134, 2011.

GOODSELL, D. S. **Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock**, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 1 -5, 1996.

GOOZ, M. ADAM-17: the enzyme that does it all. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 45, n. 2, p. 146-169, 2010.

GORDON, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, p. 1-13, 2020.

GYEBI, Gideon A. *et al.* Prevention of SARS-CoV-2 cell entry: insight from in silico interaction of drug-like alkaloids with spike glycoprotein, human ACE2, and TMPRSS2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-25, 2020.

HAGA, Shiori *et al.* Modulation of TNF- α -converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF- α production and facilitates viral entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 22, p. 7809-7814, 2008.

HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 203, n. 2, p. 631-637, 2004.

HAZARIKA, R. R. *et al.* Large-scale docking predicts that sORF-encoded peptides may function through protein-peptide interactions in *Arabidopsis thaliana*. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205179, 2018.

HE, Y. *et al.* Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3718-3726, 2005.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, 2020.

HU, Xin *et al.* Non-covalent TMPRSS2 inhibitors identified from virtual screening. **bioRxiv**, 2020.

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

HUANG, SY; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016-3034, 2010.

HUGHES, J. P. *et al.* Principles of early drug discovery. **British journal of pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239-1249, 2011. MENG, XY. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

HUI, D. S., *et al.* "The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health—The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China." **International Journal of Infectious Diseases** 91 (2020): 264-266.

HUSSAIN, Mazhar *et al.* Nebivolol attenuates neutrophil lymphocyte ratio: a marker of subclinical inflammation in hypertensive patients. **International journal of hypertension**, v. 2017, 2017.

HUSSAIN, Mushtaq et al. Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of medical virology**, 2020.

ITOH, H. A new normal for hypertension medicine with coronavirus disease-2019 (COVID-19): proposal from the president of the Japanese Society of Hypertension. **Hypertension Research**, v. 43, n. 9, p. 857-858, 2020.

JACKSON, L. A. et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. **New England Journal of Medicine**, 2020.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 1996.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, YP. P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug discovery today**, v. 16, n. 17-18, p. 831-839, 2011.

KAMP, Otto; SIESWERDA, Gertjan T.; VISSER, Cees A. Comparison of effects on systolic and diastolic left ventricular function of nebivolol versus atenolol in patients with uncomplicated essential hypertension. **The American journal of cardiology**, v. 92, n. 3, p. 344-348, 2003.

KAPETANOVIC, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. **Chemico-biological interactions**, v. 171, n. 2, p. 165-176, 2008.

KLUGE, H. Older people are at highest risk from COVID-19, but all must act to prevent community spread. *World Health Organization for Europe*. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-9/statements/statement-older-people-are-at-highest-risk-from-covid-19,-but-all-must-act-to-prevent-community-spread>> Acesso em: 29 de setembro 2020.

KOHN, W.; SHAM, L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Journal of Physical Review**, v. 140, p.1133-1138, 1965.

KUSTER, Gabriela M. et al. SARS-CoV2: should inhibitors of the renin–angiotensin system be withdrawn in patients with COVID-19?. **European heart journal**, 2020.

LABUTE, Mo. X. et al. Adverse drug reaction prediction using scores produced by large-scale drug-protein target docking on high-performance computing machines. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106298, 2014.

LASKOWSKI, R. A. et al. PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein science**, v. 27, n. 1, p. 129-134, 2018.

LAUER, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 9, p. 577-582, 2020.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlationenergy formula into a functional of the electron-density. **Journal of Physical Review**, v. 37, p. 785-789, 1998.

LENARD, John. Viral membranes. **Encyclopedia of Virology**, p. 308, 2008.

LENTZ, Kenneth E. et al. The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. **The Journal of experimental medicine**, v. 104, n. 2, p. 183-191, 1956.

LEUNG, D. T. M. *et al.* Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 2, p. 379-386, 2004.

LI, H. *et al.* TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_2, p. W219-W224, 2006.

LI, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. **New England Journal of Medicine**, 2020.

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

LIU, Tianxiao et al. Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. **Pharmacology & therapeutics**, p. 107587, 2020.

LIU, Zhixin et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 595-601, 2020.

LÓPEZ-VALLEJO, F. *et al.* Integrating virtual screening and combinatorial chemistry for accelerated drug discovery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 14, n. 6, p. 475-487, 2011.

LOVATO, Andrea; DE FILIPPIS, Cosimo. Clinical presentation of COVID-19: a systematic review focusing on upper airway symptoms. **Ear, Nose & Throat Journal**, v. 99, n. 9, p. 569-576, 2020.

LU, Chih-Chia; CHEN, Mei-Yu; CHANG, Yuh-Lih. Potential therapeutic agents against COVID-19: What we know so far. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2020.

LYU, J. *et al.* Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. **Nature**, v. 566, n. 7743, p. 224-229, 2019.

MA, Lixin et al. Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the transgenic (mRen2) rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 11, p. H2341-H2351, 2012.

MACALINO, S. J. Y. *et al.* Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of pharmacal research**, v. 38, n. 9, p. 1686-1701, 2015.

MARGOLIN, E. *et al.* Prospects for SARS-CoV-2 diagnostics, therapeutics and vaccines in Africa. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-15, 2020.

MCLEAN, A. D.; CHANDLER, G. S. "Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11 -18." **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 5639-5648, 1980.

MCNEELY, W.; KAREN L. G. "Nebivolol in the management of essential hypertension." **Drugs** 57.4 (1999): 633-651.

MEHRA, M. R. *et al.* Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. **The Lancet**, 2020.

MERCHANT, N. *et al.* Effects of nebivolol in obese African Americans with hypertension (NOAAH): markers of inflammation and obesity in response to exercise-induced stress. **Journal of human hypertension**, v. 25, n. 3, p. 196-202, 2011.

MOEN, Marit D.; WAGSTAFF, Antona J. Nebivolol. **Drugs**, v. 66, n. 10, p. 1389-1409, 2006.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. **Using AutoDock for ligand-receptor docking**, in: *Curr. Protoc. Bioinforma.*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

MOSS, Marcia L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 733-736, 1997.

MURUMKAR, Prashant R. *et al.* Virtual screening-based identification of lead molecules as selective TACE inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 1, p. 226-244, 2015.

MUTLU, Ozal *et al.* Targeting SARS-CoV-2 Nsp12/Nsp8 interaction interface with approved and investigational drugs: an in silico structure-based approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-13, 2020.

NARAYANAN, N.; NAIR, D. T. Vitamin B12 may inhibit RNA-dependent-RNA polymerase activity of nsp12 from the SARS-CoV-2 virus. **IUBMB life**, 72(10), p. 2112-2120, 2020.

NICOLAU, Lucas AD; MAGALHÃES, Pedro JC; VALE, Mariana L. What would Sérgio Ferreira say to your physician in this war against COVID-19: How about kallikrein/kinin system?. **Medical hypotheses**, v. 143, p. 109886, 2020.

OCARANZA, Maria Paz *et al.* Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 116-129, 2020.

OLAWI, N. *et al.* Nebivolol in the treatment of arterial hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 125, n. 3, p. 189-201, 2019.

OXLEY, T. J. *et al.* Large-vessel stroke as a presenting feature of Covid-19 in the young. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 20, p. e60, 2020.

PARK, YJ. *et al.* Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors. **Nature structural & molecular biology**, v. 26, n. 12, p. 1151-1157, 2019.

PASINI, Anna Fratta *et al.* Nebivolol decreases oxidative stress in essential hypertensive patients and increases nitric oxide by reducing its oxidative inactivation. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 3, p. 589-596, 2005.

PATEL, V. B. *et al.* Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: a positive feedback mechanism in the RAS. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 66, p. 167-176, 2014.

PERES, Ana Cláudia. Dias que nunca terminam: sintomas persistentes relacionados à Síndrome Pós-Covid surpreendem pacientes e pesquisadores. 2020.

PILLAIYAR, Thanigaimalai *et al.* An overview of severe acute respiratory syndrome–coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease inhibitors: peptidomimetics and small molecule chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 14, p. 6595-6628, 2016.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PRIYADARSHNI, Shivani; CURRY, Bryan H. Nebivolol. **StatPearls [Internet]**, 2020.

PULLEN, Candice; COULSON, Fiona R.; FENNING, Andrew. Effects of resveratrol and nebivolol on isolated vascular and cardiac tissues from young rats. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2014, 2014.

RAGHAVACHARI, J. S; BINKLEY, R; SEEGER, J. A. Pople, “Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions.” **Journal of Chemical Physics**, v. 72, p. 650-654, 1980.

RAGIA, G.; MANOLOPOULOS, V. G. Inhibition of SARS-CoV-2 entry through the ACE2/TMPRSS2 pathway: a promising approach for uncovering early COVID-19 drug therapies. **European journal of clinical pharmacology**, p. 1-8, 2020.

RAJPOOT, Sajjan; ALAGUMUTHU, Manikandan; BAIG, Mirza S. Dual targeting of 3CLpro and PLpro of SARS-CoV-2: A novel structure-based design approach to treat COVID-19. **Current research in structural biology**, v. 3, p. 9-18, 2020.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; DE AMORIM, H. L. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobaerium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible

mechanism of resistance. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, p. 4013-4024, 2012.

RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19—preliminary report. **New England Journal of Medicine**, 2020.

ROBERTSON, M. J.; TIRADO-RIVES, J.; JORGENSEN, W. L. Improved peptide and protein torsional energetics with the OPLS-AA force field. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 7, p. 3499-3509, 2015.

ROCHA, J. A. *et al.* Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198476, 2018.

RUBIN, Rita. As their numbers grow, COVID-19 “long haulers” stump experts. **Jama**, v. 324, n. 14, p. 1381-1383, 2020.

RUT, Wioletta *et al.* SARS-CoV-2 M pro inhibitors and activity-based probes for patient-sample imaging. **Nature chemical biology**, v. 17, n. 2, p. 222-228, 2021.

SACCO, Michael Dominic *et al.* Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveal strategy for developing dual inhibitors against Mpro and cathepsin L. **Science advances**, v. 6, n. 50, p. eabe0751, 2020.

SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 11, p. 2243-2253, 2008.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, p. 57-61, 1999.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology journal**, v. 16, n. 1, p. 1-22, 2019.

SERG, Martin *et al.* Nebivolol and metoprolol: long-term effects on inflammation and oxidative stress in essential hypertension. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 72, n. 5, p. 427-432, 2012.

SHANG, Jian *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11727-11734, 2020.

SHANG, Jian *et al.* Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221-224, 2020.

SHARP, Kumar; DANGE, Shubhangi. In-silico FDA-approved drug repurposing to find the possible treatment of Coronavirus Disease-19 (COVID-19). **Journal homepage: www. ijbpr. in**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2020.

SHI, S. et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. **JAMA cardiology**, 2020.

SILVA, Rocha E. M.; Beraldo, WT; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol**, v. 156, p. 261-273, 1949.

SILVA, V. A. Estudo, por modelagem molecular, da inibição da enzima acetohidroxiácido sintase utilizando diferentes derivados pirimidinilsalicilatos. 2017.

SKEGGS JR, Leonard T.; KAHN, Joseph R.; SHUMWAY, Norman P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 3, p. 295, 1956.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J. B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics of Operations Research**, v. 6, p. 19-30, 1981.

SONG, Z. et al. "From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight." **Viruses** 11.1 (2019): 59.

SOROKINA, M. *et al.* Structural models of human ACE2 variants with SARS-CoV-2 Spike protein for structure-based drug design. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2020.

SPARKS, M. A. et al. Classical renin-angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol* 4: 1201–1228. 2014.

SRIRAM, Krishna; INSEL, Paul A. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. **British journal of pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4825-4844, 2020.

STROPE, Jonathan D.; CHAU, Cindy H. TMPRSS2: Potential Biomarker for COVID-19 Outcomes. **Journal of clinical pharmacology**, 2020.

SUNGNAK, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 681-687, 2020.

TAI, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 6, p. 613-620, 2020.

TANG, Tiffany et al. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. **Antiviral research**, v. 178, p. 104792, 2020.

TIPNIS, Sarah R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000.

TOBLLI, Jorge E. et al. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of hypertension**, v. 28, n. 5, p. 1007-1019, 2010.

TOBLLI, Jorge Eduardo et al. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. **Vascular health and risk management**, v. 8, p. 151, 2012.

TON, AT *et al.* Rapid identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease by deep docking of 1.3 billion compounds. **Molecular informatics**, 2020.

TORTORICI, M. A.; VEESLER, D. Structural insights into coronavirus entry. In: **Advances in virus research**. Academic Press, 2019. p. 93-116.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701-1718, 2005.

VENKATARAMAIAH, Ch et al. Design, synthesis, characterization and in vitro, in vivo and in silico antimicrobial and antiinflammatory activities of a new series of sulphonamide and carbamate derivatives of a nebivolol intermediate. **RSC Advances**, v. 11, n. 7, p. 3897-3916, 2021.

VIVEK-ANANTH, R. P. et al. In silico identification of potential natural product inhibitors of human proteases key to SARS-CoV-2 infection. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3822, 2020.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WEHLAND, M., *et al.* "The effects of newer beta-adrenoceptor antagonists on vascular function in cardiovascular disease." **Current vascular pharmacology** 10.3 (2012): 378-390.

World Health Organization. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. *WHO*. Disponível em: < <https://covid19.who.int/table>>. Acesso em: 16 de março de 2021.

World Health Organization. Middle East respiratory syndrome. *WHO*. Disponível em: <<http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>>. Acesso em: 26 setembro de 2020.

YANG, J. *et al.* Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. 2020.

YANG, X. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2020.

YU, F. *et al.* Receptor-binding domain-specific human neutralizing monoclonal antibodies against SARS-CoV and SARS-CoV-2. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2020.

ZHANG, H. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 4, p. 586-590, 2020.

ZHENGLI, S. "Team of 10 researchers at the WIV (4 February 2020). "Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro". **Cell Research** 30.3: 269-271.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J.; GORBALENYA, A. E. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 4, p. 853-879, 2000.

ZOU, L. *et al.* Hydroxychloroquine and chloroquine: a potential and controversial treatment for COVID-19. **Archives of pharmacal research**, p. 1-8, 2020.