



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB**



VANESSA LIMA DO NASCIMENTO

**USO DA TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NA ESTRUTURA DO RECEPTOR  
(SBVS) PARA O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS NO COMBATE À  
COVID-19.**

**MACEIÓ – AL**

**2022**

**VANESSA LIMA DO NASCIMENTO**

**USO DA TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NA ESTRUTURA DO RECEPTOR  
(SBVS) PARA O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS NO COMBATE À  
COVID-19**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Química e  
Biotecnologia (IQB) da Universidade  
Federal de Alagoas como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Bacharelado em Química

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mendonça  
de Aquino

**MACEIÓ- AL**

**2022**

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

N244u Nascimento, Vanessa Lima do.

Uso da triagem virtual baseada na estrutura do receptor (SBVS) para o reposicionamento de fármacos no combate à COVID-19 / Vanessa Lima do Nascimento. – 2022.

94 f. : il.

Orientador: Thiago Mendonça de Aquino.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química: Bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 72-87.

Apêndices: f. 88-94.

1. COVID-19. 2. Reposicionamento de medicamentos. 3. Triagem virtual baseada na estrutura do receptor. 4. Serina proteases. 5. Simulação de acoplamento molecular. I. Título.

CDU: 615.2:578.834



**Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**  
**Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)**

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,  
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

[www.iqb.ufal.br](http://www.iqb.ufal.br) // Tel: (82) 3214-1384/1189



## ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 05 de abril de 2022

2. Aluno / matrícula: Vanessa Lima do Nascimento / 16111669

3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:  
Thiago Mendonça de Aquino  
Instituto de Química e Biotecnologia - IQB

4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):

<u>Prof. Thiago Mendonça de Aquino</u>	(Presidente)	Nota: 10
<u>Prof. Edeildo Ferreira da Silva Júnior</u>	(1º avaliador)	Nota: 10
<u>Ms. Kadja Luana Chagas Monteiro</u>	(2º avaliador)	Nota: 10

5. Título do Trabalho: **USO DA TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NA ESTRUTURA DO RECEPTOR (SBVS) PARA O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS NO COMBATE À COVID-19**

6. Local: online (plataforma Google meet)

7. Apresentação: Horário início: 9h05	Horário final: 9h40
Arguição: Horário início: 9h45	Horário final: 10h45

8. Nota final: 10 (dez)

9. Justificativa da nota. Em caso de **APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES**, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.

Não houve restrições.

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 60 minutos, tendo como resultado:

**APROVADO**

**APROVADO COM RESTRIÇÕES** – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

**NÃO APROVADO.**



**Universidade Federal de Alagoas (UFAL)**  
**Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)**

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,  
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

[www.iqb.ufal.br](http://www.iqb.ufal.br) // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 05 de abril de 2022.

Presidente: \_\_\_\_\_

1º Avaliador: \_\_\_\_\_

2º Avaliador: \_\_\_\_\_

Candidato: \_\_\_\_\_

*Este trabalho é dedicado à minha  
mãe Eliana Lima por todo amor,  
incentivo e inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder a vida e me guiar no caminho da sabedoria.

A minha mãe Eliana M<sup>a</sup> de Lima por ser o meu alicerce, por todo carinho, apoio e motivação nas horas mais difíceis.

Aos meus padrinhos Paulo e Fátima Albuquerque e, suas filhas Flávia e Paula por serem essenciais na minha trajetória de vida, pelo suporte financeiro e por me ensinarem que o meu conhecimento ninguém tira.

Ao meu orientador Thiago Mendonça de Aquino pelo acolhimento no LQM, pela paciência, dedicação, compromisso e por todos ensinamentos passados durante a realização deste trabalho e de outros projetos antecedentes.

Aos meus colegas de laboratório: Kadja Chagas, Marcone Alcântara, Giovanni Ortiz, Igor Nascimento, Nathalia Monteiro, Ana Beatriz Flor, Gabriel Passos, Matheus Gabriel e Prof<sup>o</sup> Edeildo Ferreira pelas risadas, amizade, auxílio e companheirismo. Em especial, eu agradeço a Erica Rodrigues e Paulo Fernando por todos os conhecimentos transmitidos, por serem tão atenciosos e fundamentais no meu percurso como estudante de iniciação científica.

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), do Instituto de Matemática (IM) e do Instituto de Física (IF) por transmitir o aprendizado necessário para a minha formação na área de química.

A FAPAL, CAPES e ao CNPq pelo incentivo financeiro durante todas as minhas pesquisas realizadas dentro do LQM.

A todas outras pessoas que se fizeram presente em minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu nunca desistisse dos meus sonhos.

*Aproveita o dia,  
Não deixes que termine sem teres  
crescido um pouco.  
Sem teres sido feliz, sem teres  
alimentado teus sonhos.*

***Carpe diem, Walt Whitman***



## RESUMO

Os esforços da comunidade científica na buscar opções terapêuticas para o tratamento da COVID-19 tornou-se impreterível em razão da gravidade da situação, com altos índices de casos e elevadas taxas de mortalidade ao redor do mundo. Por causa da ausência de fármacos específicos a condição clínica de diversos pacientes pode ser agravada por infecções secundárias letais ocasionadas por bactérias e fungos. Diante disto, a utilização de estratégias da química medicinal, como a triagem virtual e o reposicionamento de fármacos, tornaram-se ainda mais relevantes para o enfrentamento da pandemia, tendo em vista que ferramentas como estas reduzem o tempo de pesquisa, o custo e o número de compostos a serem sintetizados e testados. Neste trabalho foi utilizada uma metodologia de triagem virtual baseada na estrutura do receptor (*SBVS - Structure-Based Virtual Screening*) com o objetivo de identificar fármacos aprovados ou em fase clínica de desenvolvimento não reportados na literatura como novas alternativas terapêuticas para a COVID-19. A linha de pesquisa que foi explorada encontra-se fundamentada na estratégia de reposicionamento de fármacos inibidores que possam se ligar de forma covalente e irreversível à enzima serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2). Inicialmente, foi realizada a busca de fármacos aceptores de Michael em bancos de dados como NIH Chemical Genomics Center (NCGC), Pharmaceutical Collection (NPC), ChEMBL, DrugBank e PubChem. Estes fármacos foram desenhados e tiveram a minimização da energia estrutural procedida. Com a estrutura tridimensional de TMPRSS2 ainda não reportada até o início de abril de 2021, foi realizada a modelagem molecular por homologia deste alvo biológico usando como molde a serina protease hepisina. Com isto, verificou-se que a identidade sequencial entre o molde e o alvo de interesse apresentava 33.82%, com cobertura de 70% e desvio quadrático médio (RMSD) igual 0.111. Também foi conferido que os resíduos pertencentes a tríade catalítica da TMPRSS2 (Ser441, His296 e Asp345) encontravam-se conservados e, por meio do gráfico de Ramachandran certificou-se que 92.2% de todos os resíduos se encontram em regiões favoráveis, e 99.1% de todos os resíduos em regiões permitidas. Em seguida, efetuou-se a validação do protocolo virtual de docking com diversas substâncias inibidores da TMPRSS2, em que foi avaliado tanto a estrutura homóloga quanto a que foi resolvida experimentalmente. Após realizar o docking com todas as moléculas nos dois arquivos .pdb da enzima, observou-se que as mesmas apresentaram resultados mais consistente de interação com os resíduos essenciais do sítio catalítico quando utilizado a estrutura 3D construída por homologia. Dessa forma, foi utilizado esta última para a execução das etapas de ancoragem molecular com inspeção visual e obtenção dos valores de fitscore, e também dos cálculos de energia de docking covalente dos fármacos potenciais oriundos do processo anterior. Para a triagem virtual, empregou-se parâmetros como filtros de seleção dos fármacos potenciais inibidores da TMPRSS2, sempre comparando com os fármacos padrões *camostato* e *nafamostato*: valores de fitscore, interação como os resíduos da tríade catalítica, distância em angstrom entre o oxigênio da Ser441 e o carbono eletrofílico dos aceptores de Michael, e valores de energia do docking covalente. Assim, dentro os 230 ligantes que foram ancorados na TMPRSS2 e corresponderam os parâmetros designados, identificou-se três fármacos (dois antibióticos e um com ação anticâncer) como possíveis candidatos para o reposicionamento no tratamento da COVID-19.

**Palavras-Chave:** COVID-19; Reposicionamento de fármacos; SBVS; TMPRSS2; Docking.

## ABSTRACT

The efforts of the scientific community in seeking therapeutic options for the treatment of COVID-19 have become imperative due to the seriousness of the situation, with high case rates and high mortality rates around the world. Because of the absence of specific drugs, the clinical condition of many patients can be aggravated by lethal secondary infections caused by bacteria and fungi. In view of this, the use of medicinal chemistry strategies, such as virtual screening and drug repositioning, have become even more relevant in the fight against the pandemic, since tools such as these reduce the research time, the cost and the number of compounds to be synthesized and tested. In this work, a *Structure-Based Virtual Screening* (SBVS) methodology was used to identify approved or clinically developed drugs not reported in the literature as new therapeutic alternatives for COVID-19. The line of research that was explored is based on the strategy of repositioning inhibitor drugs that can covalently and irreversibly bind to the transmembrane serine protease enzyme 2 (TMPRSS2). Initially, a search for Michael acceptor drugs was conducted in databases such as NIH Chemical Genomics Center (NCGC), Pharmaceutical Collection (NPC), ChEMBL, DrugBank and PubChem. These drugs were designed and had structural energy minimization proceeded. With the three-dimensional structure of TMPRSS2 not yet reported by early April 2021, molecular homology modeling of this biologic target was performed using the serine protease hepsin as a template. With this, the sequence identity between the template and the target of interest was found to be 33.82%, with 70% coverage and a root mean square deviation (RMSD) equal to 0.111. It was also verified that the residues belonging to the catalytic triad of TMPRSS2 (Ser441, His296, and Asp345) were conserved, and by means of Ramachadran plot it was certified that 92.2% of all residues are in favorable regions, and 99.1% of all residues are in allowed regions. Next, validation of the virtual docking protocol was performed with several TMPRSS2 inhibitors, where both the homologous structure and the experimentally solved one were evaluated. After performing the docking with all molecules in the two .pdb files of the enzyme, it was observed that they presented more consistent results of interaction with the essential residues of the catalytic site when using the 3D structure built by homology. Thus, the latter was used for the execution of the molecular docking steps with visual inspection and obtaining the fitscore values, and also the covalent docking energy calculations of the potential drugs arising from the previous process. For the virtual screening, parameters were used as selection filters for potential TMPRSS2 inhibitor drugs, always comparing with *camostat* and *nafamostat* standard drugs: fitscore values, interaction with catalytic triad residues, angstrom distance between the oxygen of Ser441 and the electrophilic carbon of Michael acceptors, and covalent docking energy values. Thus, within the 230 ligands that were anchored to TMPRSS2 and matched the designated parameters, three drugs (two antibiotics and one with anticancer action) were identified as possible candidates for repositioning in the treatment of COVID-19.

**Keywords:** COVID-19; Drug repositioning; SBVS; TMPRSS2; Docking.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Estrutura do SARS-CoV-2.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2 - Mecanismo de entrada do vírus SARS-CoV-2.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 – Panorama histórico dos inibidores covalentes e suas datas de aprovação. Em verde claro estão destacados os centros eletrofílicos (<i>warheads</i>) dos fármacos.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 – Esquema do mecanismo genérico da interação entre um alvo biológico e um inibidor covalente.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5 – Relação dos aceptores de Michael mais comuns.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 6 - Mecanismos covalentes de ligação direta entre molécula-receptor. (Nu:- corresponde sítio nucleofílico de uma proteína).....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7 – Fármacos inibidores covalente de sucesso.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 8 – Estruturas dos fármacos nafamostato e camostato, respectivamente.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 9 – Fluxograma do processo geral da modelagem por homologia.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 10 – Exemplo de alinhamento entre o receptor alvo quimiocina tipo 5 (CCR5) e o molde (1F88). Regiões marcadas com quadrados vermelhos indicam que os resíduos conhecidos estão conservados. O programa CLUSTAL foi utilizado para o alinhamento.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 11 - Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína homeobox Hox-B13. Neste exemplo, quase 89% dos resíduos de aminoácidos na proteína modelada ocupam regiões favoráveis, 6,4% dos resíduos ocupam regiões permitidas, e os 5% restantes ocupam a região não favorável, respectivamente.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12 - Etapas computacionais na SBVS, ilustrados pela identificação de uma nova classe de inibidores de anidrase carbônica.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 13 – Esquema geral da metodologia adotada para o alcance dos objetivos do presente trabalho.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 14 – Estruturas moleculares, concentração inibitória média IC<sub>50</sub> em azul e ensaio enzimático em preto pelo (A) camostato e (B) nafamostato. No gráfico em (C) encontra-se</b>	

a concentração de TMPRSS2 ativa calculada e as constantes de dissociação aparente $K_i^{app}$ ajustadas pela equação de Morrison para os fármacos camostato e nafamostato.....	48
<b>Figura 15 - Grupos funcionais pesquisados nos fármacos caracterizados como Aceptores de Michael.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 16 - Superfície de energia potencial genérica. Um ponto de inflexão (<math>+x_d</math>) encontra-se localizado entre dois mínimos locais (<math>+x^1_s</math> e <math>+x^2_s</math>). Os pontos <math>+x^1_m</math> e <math>+x^2_m</math> são dois mínimos locais localizados na direção ortogonal.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 17 – Alinhamento comparativo entre o molde 5ce1.1A (verde) e o modelo homólogo da TMPRSS2 (azul ciano) em três diferentes poses. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18 - Alinhamento da sequência de moldes da TMPRSS2 e Serina Protease Hepsina (5CE1.A). Em contornos pretos os resíduos de aminoácidos conservados de His296, Asp345 e Ser441. (Obs.: NP_005647.3 corresponde ao alvo TMPRSS2).....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 19- Resíduos-chave (amarelo) do sítio ativo de ligação.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20 - Estrutura tridimensional modelada da TMPRSS2.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 21 – Gráfico da pontuação de Z-Score.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 22 – Estimativa de qualidade global do QMEAN para o modelo.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 23 – Gráfico da estimativa da qualidade local do modelo construído por homologia.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 24 – Diagrama de Ramachandran.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 25 – Alguns inibidores ativos e inativos de TMPRSS2 utilizados no banco de dados.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 26 – Alinhamento entre os resíduos da tríade catalítica presentes no pdb da TMPRSS2 homóloga (azul ciano) e também no pdb 7MEQ (rosa magenta).....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 27 – Representação bidimensional dos fármacos Camostato (A) e Nafamostato (B) realizando interações com alguns resíduos da enzima TMPRSS2.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 28 - Diagrama esquemático da abordagem <i>flexible side chain method</i>, com a proteína em cinza e o ligante em preto.....</b>	<b>65</b>

**Figura 29 – Cefpiramida (A), Cefotaxima (B) e Pelitinibe (C). Em destaque verde o grupo eletrofílico participante da ligação covalente, em detalhe branco a enzima TMPRSS2 no formato cartoon e superfície, em roxo o ligante fazendo a ligação covalente com o resíduo de Ser441 em amarelo.....68**

**Figura 30 - Interações dos fármacos promissores com os diferentes tipos de resíduos (A Cefpiramida; B – Cefotaxima e C - Pelitinibe).....69**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Cinquenta melhores templates filtrados pelo SWISS-MODEL.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela 2 - Dados dos estudos realizados como os melhores fármacos.....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 3 – Dados dos dockings com o pdb 7MQE.....</b>	<b>88</b>
<b>Tabela 4 – Dados dos dockings com o pdb da enzima homóloga.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACE2 – Angiotensin-converting enzyme 2 (enzima conversora da angiotensina 2)

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade

AM1 - Austin Model 1

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BTK - Bruton's tyrosine kinase (Tirosina Quinase de Bruton)

COX - ciclo-oxigenase

DDP-4 - dipeptidyl peptidase 4 (dipeptidil peptidase 4)

EGFR - Epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)

FDA - Food and Drug Administration

GMQE - Global Model Quality Estimation

LBVS - ligand-based virtual screening

IDDT - Local Distance Difference Test

MM2 - Molecular Mechanics 2

MurA - manganese uptake regulator (regulador de absorção de manganês)

P2Y<sub>12</sub> - quimiorreceptor para difosfato de adenosina

P&D - pesquisa e desenvolvimento

PDB - arquivo Protein Data Bank

PDQT - Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)

PM3 - Parametric Method 3

PM7 - Parametric Method 7

QSAR - quantitative structure-activity relationship

QMEAN - Qualitative Model Energy ANalysis

RMSD - Root mean square deviation

SARS-CoV-2 - severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2)

SBVS - structure-based virtual screening

SMTL - SWISS-MODEL template library

TMPRSS2 - serina protease transmembrana 2

TV- Triagem virtual

PGBA - p-guanidinobenzoic acid ou ácido p-guanidinobenzóico

NA - 6-amidino-2-naphthol ou 6-amidino-2-naftol

## LISTA DE SÍMBOLOS

$C\alpha$  - Carbono alfa

$C\alpha$ -C - ligação entre carbono alfa e carbono

$C\beta$  - Carbono beta

N- $C\alpha$  - ligação entre nitrogênio e carbono alfa

$N\delta$  - Nitrogênio

$Na^+$  - íon sódio

$K^+$  - íon potássio

$K_i^{app}$  - constante de dissociação aparente

$\varphi$  - fi (ou phi)

$\psi$  - psi

Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V



## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>2.1 - COVID-19: Aspectos gerais</b> .....	18
<b>2.2 – Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2) no contexto da COVID-19</b> .....	19
<b>2.3 – Inibidores Covalentes</b> .....	21
<b>2.4 - Reposicionamento de fármacos</b> .....	26
<b>2.5 - Fármacos de referência para o presente trabalho</b> .....	28
<b>2.6 – Modelagem molecular</b> .....	29
<b>2.6.1 – Modelagem por homologia</b> .....	30
<b>2.6.2 – Estratégia <i>Structure-Based Virtual Screening</i> (SBVS)</b> .....	35
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3.1 – Objetivo geral</b> .....	39
<b>3.2 – Objetivos específicos</b> .....	39
<b>4 – MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1 – Materiais</b> .....	41
<b>4.2 – Seleção das estruturas dos fármacos</b> .....	42
<b>4.3 – Minimização das estruturas dos fármacos</b> .....	42
<b>4.4 – Estrutura 3D e modelagem por homologia do alvo TMPRSS2</b> .....	42
<b>4.5 – Validação do processo de ancoragem molecular</b> .....	43
<b>4.6 - Ancoragem molecular</b> .....	45
<b>4.7 – Docking covalente</b> .....	45
<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47

<b>5.1 - Escolha dos fármacos de referência.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2 - Planejamento dos fármacos (ligantes).....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 - Modelagem por homologia da enzima TMPRSS2.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4 – Validação do processo de ancoragem molecular.....</b>	<b>60</b>
<b>5.5 – Ancoragem molecular e docking covalente.....</b>	<b>62</b>
<b>6 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>88</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que doenças emergentes causam surtos, epidemias ou pandemias, dependendo do quão significativo é o seu impacto deixado na humanidade. Com os primeiros casos na cidade chinesa de Wuhan em dezembro de 2019, a pandemia da COVID-19 gerou uma demanda global de ações científico-tecnológicas para o melhor entendimento dos aspectos da doença provocada pelo vírus SARS-CoV-2, o que inclui otimização de diagnósticos precisos, estudos de patogênese, sequenciamento genômico e identificação de um conjunto de medidas terapêuticas para tratar pacientes infectados.

Os estudos com o fármaco remdesivir, desenvolvido para tratar a doença causada pelo vírus Ebola, apresentaram respaldo na literatura internacional e fizeram com este tenha sido aprovado recentemente como o primeiro tratamento da COVID-19 em pacientes hospitalizados. No entanto, é necessário ter cautela quando se tratando da terapia medicamentosa da COVID-19. Ensaio clínicos randomizados mostram que o remdesivir não reduz a mortalidade, porém acelera com eficiência o tempo de recuperação dos pacientes, com baixos efeitos colaterais (LAI et al., 2021; GOLDMAN et al., 2020). Porém, estudos mais robustos deverão apontar em qual direção a utilização deste fármaco deve ir. Sendo assim, necessário buscar terapias mais específicas e acessíveis economicamente para os pacientes que sofrem com os sintomas da infecção pelo SARS-CoV-2. Esta ideia vale também para o desenvolvimento acelerado de vacinas, mesmo tendo contribuído para redução de casos, hospitalizações e óbitos. A infecção pelo novo coronavírus oferece riscos, principalmente para países com poucos recursos.

Um outro fator que deve ser levado em consideração é o desenvolvimento “típico” de um novo fármaco, no qual estima-se que varia entre 10 a 17 anos, cuja probabilidade de sucesso é abaixo de 10% em todo processo, que vai desde o planejamento até a comercialização (ASHBURN e THOR, 2004). Neste sentido, o uso de um fármaco conhecido para uma nova enfermidade, estratégia da Química Medicinal conhecida como reposicionamento, diminui o tempo necessário para o desenvolvimento de um novo fármaco, uma vez que todas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas encontram-se descritas, rotas de formulação e fabricação são amplamente conhecidas, incluindo entrada na fase clínica mais rapidamente e proporcionando redução de custo de pesquisa (POROIKOV e DRUZHILOVSKIY, 2019; ARROWSMITH e HARRISON, 2012). Vale salientar que o reposicionamento é uma estratégia antiga na Química Medicinal, em que vários fármacos conhecidos obtiveram sucesso em análises farmacológicas

e clínicas como a zidovudina, sildenafil, aspirina, talidomida, celecoxibe, cetoconazol, dentre outros (PUSHPAKOM et al., 2019).

Assim como MERS-CoV e SARS-CoV, o vírus SARS-CoV-2 possui a sua entrada facilitada nas células hospedeiras susceptíveis por meio de enzimas ligadas às membranas delas, em particular a ACE2 (enzima conversora da angiotensina 2) e TMPRSS2 (serina protease transmembranar 2). A ACE2 atua como um receptor de entrada para o vírus, enquanto a TMPRSS2 atua proteoliticamente a proteína Spike (chamada de S) presente na superfície do novo coronavírus (MATSUYAMA et al., 2010; SHIRATO et al., 2013; HOFFMANN et al., 2020). A TMPRSS2 é tida como um alvo promissor no contexto da SARS-CoV-2, uma vez que se trata de uma enzima conhecida geneticamente, cuja inibição de sua atividade representa um baixo risco de resistência. Estudos pré-clínicos com os fármacos nafamostatato e camostatato, aprovados no Japão para o tratamento de pancreatite crônica, demonstraram que eles são excelentes inibidores da atividade da TMPRSS2 (HOFFMANN et al., 2020; YAMAMOTO et al., 2020; WEIS et al., 2021). Um indicativo útil para a busca de novos fármacos promissores frente à esta enzima, visto que a TMPRSS2 se trata de uma serina protease, onde em teoria o oxigênio da serina atuando como nucleófilo pode atacar o carbono eletrofílico de inibidores covalentes como nafamostatato e o camostatato, ocasionando assim na inibição irreversível da enzima e, por consequência, não permitiria a fusão viral proporcionada pelo SARS-CoV-2 na célula humana hospedeira (HEMPEL et al., 2021; ZHU et al., 2021).

Portanto, com o referido trabalho pretende-se contribuir na busca de outros inibidores irreversíveis frente à TMPRSS2 que se mostrem como terapias efetivas, econômicas e amplamente disponíveis para a COVID-19. Para isto, foi empregado o método computacional da triagem virtual baseada na estrutura do receptor (do inglês, *structure-based virtual screening*), explorando uma linha de pesquisa com parâmetro na estratégia de reposicionamento de fármacos não reportados na literatura como alternativas terapêuticas.

## 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E JUSTIFICATIVA

### 2.1 - COVID-19: Aspectos gerais

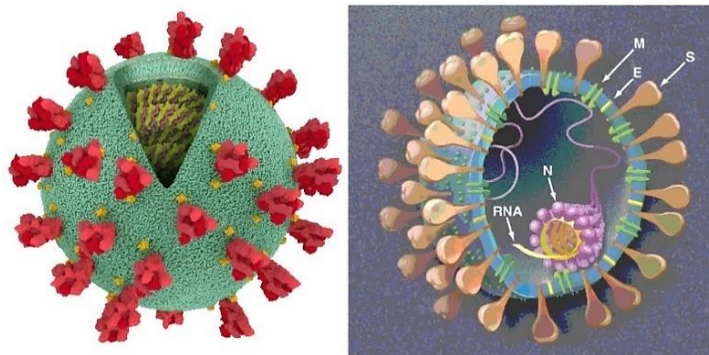
Diversos casos incomuns de uma pneumonia severa foram relatados na cidade chinesa de Wuhan em dezembro de 2019. Diante de tal ocorrência, esses casos foram rastreados e identificou-se que se tratava de um novo coronavírus, SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* - coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) (SOHRABI et al., 2020). Estima-se que mais de 280 milhões de pessoas ao redor do mundo foram acometidas pela doença até o fim do mês de dezembro de 2021, provocando aproximadamente 5,4 milhões de mortes (WHO, 2021). No Brasil, até a primeira quinzena do mês de janeiro de 2022, o número de casos confirmados por COVID-19 foi estimado em mais de 23 milhões, com aproximadamente 621 mil mortes (WHO, 2022; OUR WORLD IN DATA, 2022).

Os coronavírus (CoVs) pertencem a família *Coronaviridae*, que por sua vez se divide em duas subfamílias: *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*. A subfamília *Orthocoronavirinae* se dividem em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (THARAPPEL et al., 2020). De todos esses gêneros, há espécies que causam infecções em seres humanos e são conhecidos por existirem ao longo dos tempos. A comunidade científica considera os coronavírus como enzoóticos, isto é, pertencentes ao seu animal hospedeiro natural, mas que de alguma maneira conseguiu ultrapassar a barreira entre as espécies de animais tornando-os com virulência considerável (LAU et al., 2005; REST e MINDELL, 2003). O vírus SARS-CoV-2 é pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, assim como HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV (XIA et al., 2020).

A maioria das pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 apresentam sintomas leves a moderados, como febre, tosse, cansaço, perda de paladar ou olfato, dor de garganta, dor de cabeça, diarreia, erupção na pele ou descoloração dos dedos das mãos ou dos pés, olhos vermelhos ou irritados. Entretanto, algumas pessoas podem desenvolver a forma mais grave da doença, cujo os sintomas são dificuldade em respirar, perda de fala ou mobilidade, confusão, dor no peito e até mesmo a morte em casos clínicos irreversíveis (WHO, 2021). Também é reportado na literatura a incidência de manifestações trombóticas causada por uma coagulação sanguínea intensa que atinge os órgãos como pulmão, coração, cérebro, fígado e rins (VINAYAGAM e SATTU, 2020; ORTEGA-PAZ et al., 2021).

Levando em consideração o aspecto estrutural, o SARS-CoV-2 contém quatro estruturas proteicas designas por S (proteína spike, a qual realiza o intermédio entre a unidade viral e os receptores das células hospedeiras), E (proteína envelope, a qual protege o RNA viral por meio de um envoltório), M (glicoproteína de membrana, responsável pela reunião de vírions pela interação com proteínas S, promovendo sua retenção no retículo endoplasmático intermediário para a incorporação em novos vírions) e N (proteína do nucleocapsídeo, a qual possui a capacidade de se ligar ao genoma do RNA viral) e dezesseis proteínas não-estruturais, Nsp1-16 (Figura 1) (WANG et al., 2020; MASTERS et al., 2006). Um fato singular é que tanto o SARS-CoV quanto o SARS-CoV-2 possuem relação filogenética, apresentando 89.8% da identidade sequencial em suas proteínas S (ZHOU et al., 2020; XIA et al., 2020). A proteína S possui duas subunidades: S1 (subunidade de ligação do receptor) e S2 (subunidade de fusão de membranas). Entre as regiões S1 e S2 situa-se sítios de clivagem que permitem sofrer ação de determinadas proteases celulares conforme o tipo do coronavírus. Para a ativação do SARS-CoV-2 nas células humanas hospedeiras, o vírus é suscetível a ação das catepsinas lisossomais, furinas, tripsinas e serinas transmembranas tipo 2 (HOFFMANN, KLEINE-WEBER e PÖHLMANN; 2020; OU et al., 2020; BESTLE et al., 2020).

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



FONTE: UZUNIAN, 2020.

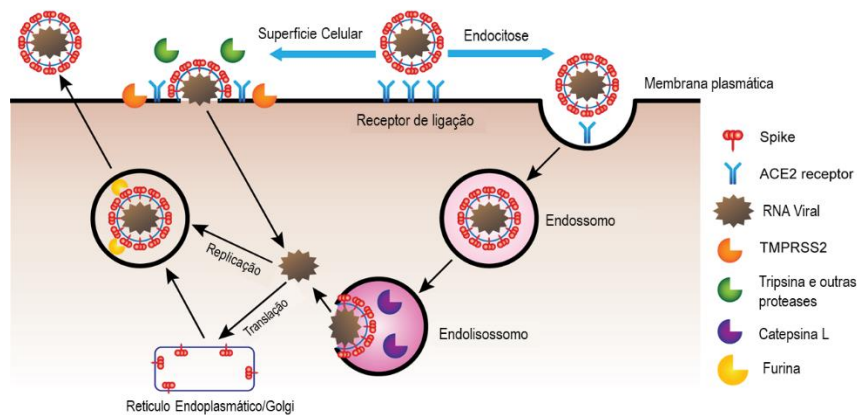
## 2.2 – Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2) no contexto da COVID-19

A TMPRSS2 se trata de uma enzima chave utilizada por diversos vírus, incluindo o SARS-CoV-2, como ferramenta de entrada em células humanas hospedeiras. Também é regulada positivamente em resposta aos hormônios androgênicos em células de câncer de

próstata (AFAR et al., 2001). Em um panorama geral de sua função biológica normal, a TMPRSS2 tem sido correlacionada a processos de digestão, remodelação de tecidos, coagulação do sangue, fertilidade, respostas inflamatórias, invasão de células tumorais, apoptose e estímulos de dor (LAM et al., 2015; AFAR et al., 2001; THUNDERS e DELAHUNT, 2020). A ativação desta enzima é realizada por meio da sua clivagem proteolítica de caráter autocatalítica em um de seus domínios, assim quando liberada na zona extracelular a serina protease pode interagir com outras proteínas na superfície da célula, com proteínas solúveis, com componentes de matriz e com proteínas em células adjacentes; os três resíduos no sítio ativo desta enzima são His296, Asp345 e Ser441, considerados cruciais para a sua atividade (THARAPPEL et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2021).

Em concordância com que já foi mencionado anteriormente, o mecanismo de entrada do vírus causador da COVID-19 tem dependência da ACE2 como receptor para a ligação na proteína S e da TMPRSS2 como iniciador do processo de fusão celular (Figura 2). Tendo em vista que esta última contém um domínio de serina-protease extracelular semelhante à tripsina, que pode ativar proteoliticamente a proteína S na superfície das partículas virais do SARS-CoV-2 permitindo a sua entrada nas células hospedeiras (HOFFMANN et al., 2020; JACKSON et al., 2022). Contudo, é importante lembrar que o SARS-CoV-2 pode ser clivado por catepsinas lisossomais, conferindo-lhe a possibilidade alternativa de entrada celular através de via endocítica (MURGOLO et al., 2021; HOFFMANN et al., 2020). Também vale ressaltar que as expressões gênicas ACE2 e TMPRSS2 estão presentes nas células humanas dos alvéolos pulmonares, no coração, no trato gastrointestinal, na cavidade nasal, nas regiões conjuntivas e pterígiais (THARAPPEL et al., 2020; THUNDERS e DELAHUNT, 2020).

**Figura 2 - Mecanismo de entrada do vírus SARS-CoV-2.**



FONTE: MURGOLO et al., 2021 (ADAPTADO).

Entre todos os alvos identificados do vírus SARS-CoV-2, a TMPRSS2 tem sido relatada como um alvo biológico importante para as estratégias de descoberta de fármacos contra a COVID-19. A TMPRSS2 é uma serina protease, em que o oxigênio do seu resíduo essencial de serina pode atuar como nucleófilo, atacando fármacos com centro eletrofílico. Com isto, ocorrerá uma inibição irreversível pela formação de uma ligação covalente, conseqüentemente, inibindo a entrada e infecção do SARS-CoV-2 na célula humana hospedeira (COOPER e HAUSMAN, 2010; NASCIMENTO et al., 2021; HEMPEL et al., 2021). Embora a TMPRSS2 esteja presente no organismo humano, vários estudos descritos na revisão de *NASCIMENTO et al. (2021)* revelam que esta protease é bastante promissora.

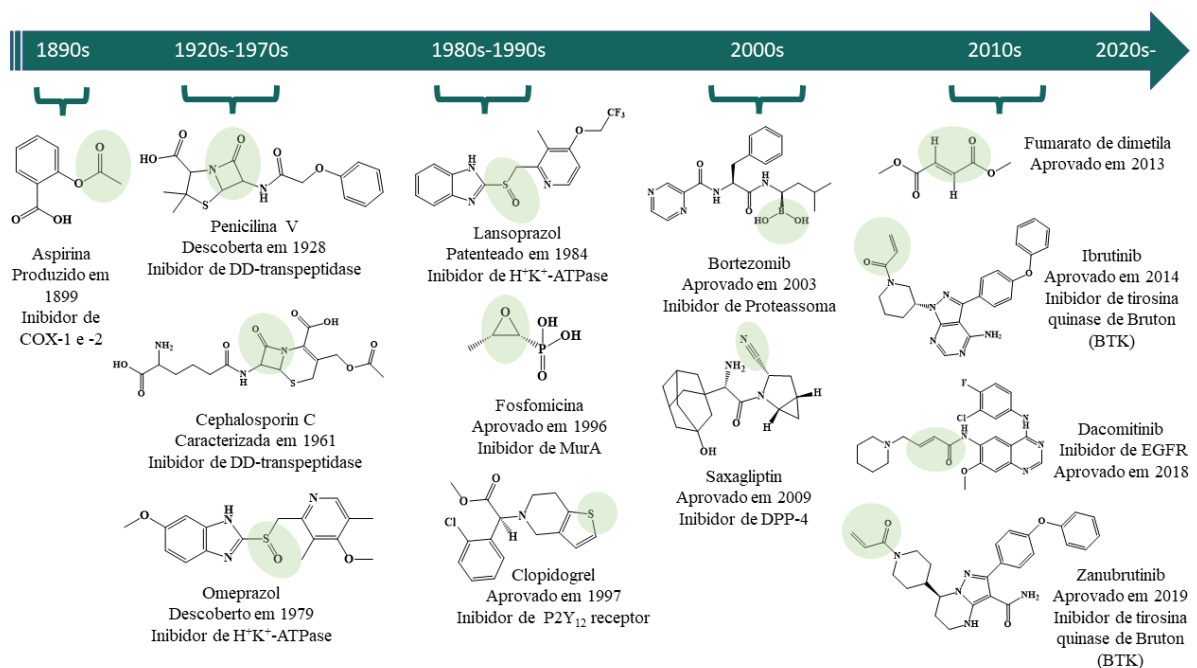
### 2.3 – Inibidores Covalentes

Conhecidos como inibidores não-clássicos, os inibidores covalentes correspondem a uma classe de compostos que se ligam a um alvo de modo seletivo por meio da formação de uma ligação covalente entre a molécula e o receptor, a qual pode ser reversível ou irreversível, dependendo do tipo estrutural do inibidor (DU et al, 2021). Tendo um passado histórico singular, o primeiro inibidor covalente ao ser produzido e introduzido no tratamento de dor e inflamação no final do século XIX foi o ácido acetilsalicílico, conhecido como aspirina. Até 1970 não era conhecido o mecanismo de ação deste fármaco que atua na inibição covalente e irreversível das ciclo-oxigenases (COX)-1 e -2, enzimas responsáveis pela biossíntese de



prostaglandinas (BAUER, 2015). Posteriormente, ao longo dos anos surgiram outros fármacos de sucesso (Figura 3), muitas vezes descobertos por “serendipidade” (ao acaso), tais como a penicilina V, cefalosporina C, omeprazol, lansoprazol, fosfomicina, clopidogrel, bortezomib, saxagliptin, fumarato de dimetila, ibrutinibe, dacomitinibe, zanubrutinibe, dentre outros (SUTANTO e KONSTANTINIDOU, 2020; BAUER, 2015).

**Figura 3 – Panorama histórico dos inibidores covalentes e suas datas de aprovação. Em verde claro estão destacados os centros eletrofílicos (*warheads*) dos fármacos.**

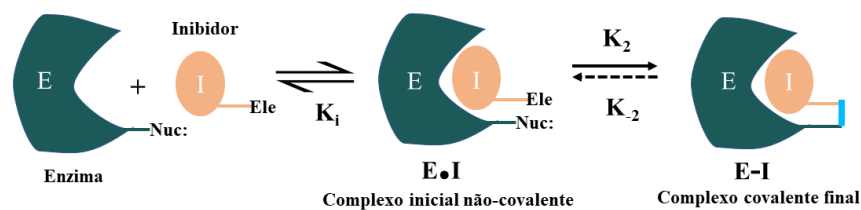


FONTE: SUTANTO e KONSTANTINIDOU, 2020 (ADAPTADO).

Os inibidores covalentes têm sido bastante estudados com a finalidade de interagir com resíduos de aminoácidos específicos do alvo biológico, como os resíduos de cisteína, serina, treonina, tirosina e lisina (GEHRINGER, 2020). Um fato em comum dos inibidores covalentes é que eles possuem algum centro eletrofílico, conhecido como *warhead*, para que haja a inibição do receptor biológico, conforme pode ser visto na figura 3. O mecanismo genérico da interação covalente entre uma molécula e um alvo biológico pode ser descrito conforme a equação esquematizada da figura 4, onde a inibição ocorre em duas etapas: Inicialmente o composto interage de forma não-covalente com a proteína-alvo, em que o grupo eletrofílico pertencente à molécula está à disposição de um nucleófilo específico de um determinado resíduo de

aminoácido da proteína em questão. O complexo resultante no equilíbrio sofre então uma formação de ligação específica, dando origem a um complexo com uma nova ligação covalente. Nos casos em que a formação da ligação é efetivamente irreversível, a constante de equilíbrio  $K_2$  será essencialmente zero (SINGH et al, 2011; STRELOW, 2017; DE CESCO et al., 2017).

**Figura 4 – Esquema do mecanismo genérico da interação entre um alvo biológico e um inibidor covalente.**



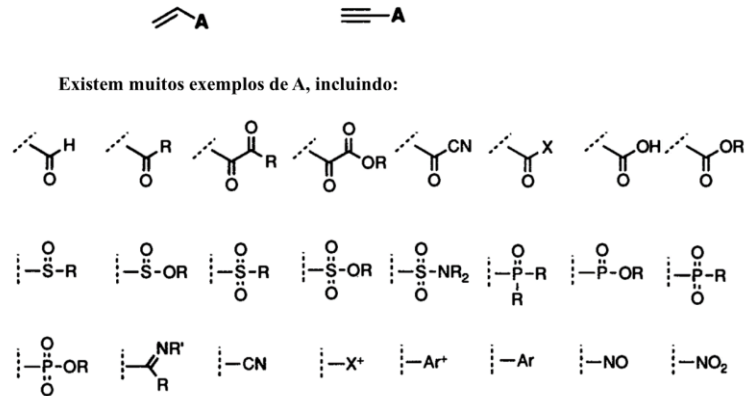
FONTE: SINGH et al., 2011 (ADAPTADO).

Durante os últimos 50 anos, a comunidade científica mostrou-se cética em relação aos inibidores covalentes. Problemas de reações adversas que foram associadas a classes de agentes terapêuticos carbonilados, que por sua vez modificam covalentemente as proteínas celulares via reações metabólicas e que contêm uma funcionalidade eletrofílica reativa pré-existente na estrutura parental propícia à biotransformação (EVANS et al., 2004; ERVE, 2006; ZHOU et al., 2005). Além disso, existem alguns pontos negativos como: risco potencial de toxicidade idiossincrática e imunogenicidade, causando reações de hipersensibilidade; alto risco se o inibidor covalente tiver ausência de especificidade; e também este não é ideal para alvos quando o mecanismo de ação requer tempo de residência curto, inibição transitória ou inibição parcial (JOHNSON, WEERAPANA e CRAVATT, 2010). Entretanto, com o sucesso de vários inibidores covalentes anticancerígenos nos últimos 20 anos, a utilização de estratégias de triagem proteômica e de triagem de fragmentos reativos para encontrar alvos que antes eram considerados invencíveis, foram fatores que fizeram os químicos medicinais mudarem os seus posicionamentos quanto aos compostos que interagem covalentemente com os seus devidos receptores (SUTANTO e KONSTANTINIDOU, 2020; MAH, THOMAS e SHAFER, 2014). Como pontos positivos destacam-se: eficiência bioquímica elevada, traduzindo-se em doses mais baixas e redução dos efeitos *off-target* (não seletivos); menor sensibilidade aos parâmetros farmacocinéticos; maior sensibilidade ao efeito farmacodinâmico; maior tempo de residência e

dosagem menos frequente; menores concentrações de medicamentos necessárias para a eficácia; estratégia mais eficiente quando é necessária a inativação completa do receptor; inibição de alvos com locais de ligação incontroláveis e com pouca profundidade; e mitigação pela própria ligação covalente no desenvolvimento contra a resistência ao medicamento resultante da mutação no sítio de ligação (BAUER, 2015, JOHNSON, WEERAPANA e CRAVATT, 2010).

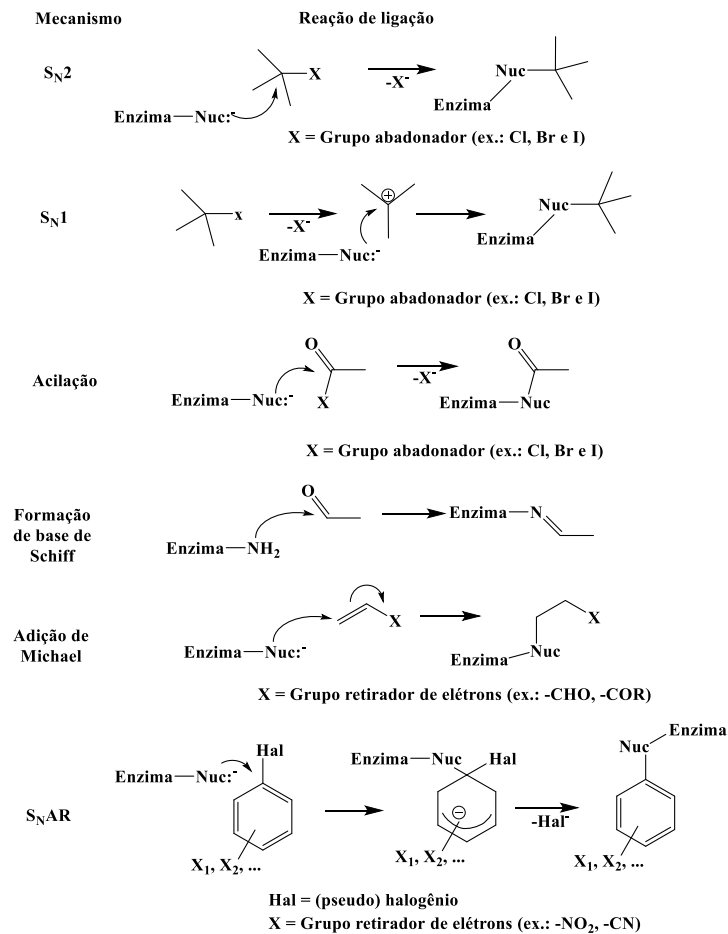
Em nossa pesquisa foram utilizados inibidores que tenham grupos eletrofílicos: epóxidos, halo-alcanos, fluorofosnatos, beta-lactonas e lactonas. Além destes, temos interesse em inibidores covalentes aceptores de Michael (Figura 5), os quais são uma classe de compostos que contém em sua estrutura grupos retiradores de densidade eletrônica e um sistema  $\alpha, \beta$ -insaturado. Os mecanismos de vinculação covalente entre molécula-receptor configuram reações  $S_N2$ ,  $S_N1$ , acilação, formação de base de Schiff, adição de Michael (Figura 6) e substituição aromática ( $S_NAr$ ), em alguns casos a molécula intermediária pode ser hidrolisada posteriormente (PERLMUTTER, 1992; SCHWÖBEL et al., 2011; BARREIRO e FRAGA, 2015; KALGUTKAR e DALVIE, 2012). Os aceptores de Michael são reconhecidos por possuir elevada reatividade e amplo espectro de bioatividade, onde o aumentando da afinidade de ligação de proteínas com locais de ligação pouco profundos e a capacidade de superar a resistência aos fármacos levantou interesse no projeto covalente de medicamentos mundo afora; desse modo vale citar alguns casos de sucesso (Figura 7) como telaprevir (inibidor da HCV protease), gefitinibe (inibidor do EGFR), spebrutinib (inibidor de BTK), entre outros (JACKSON et al., 2017; POTASHMAN e DUGGAN, 2009; DE CESCO et al., 2017).

Figura 5 – Relação dos aceptores de Michael mais comuns.



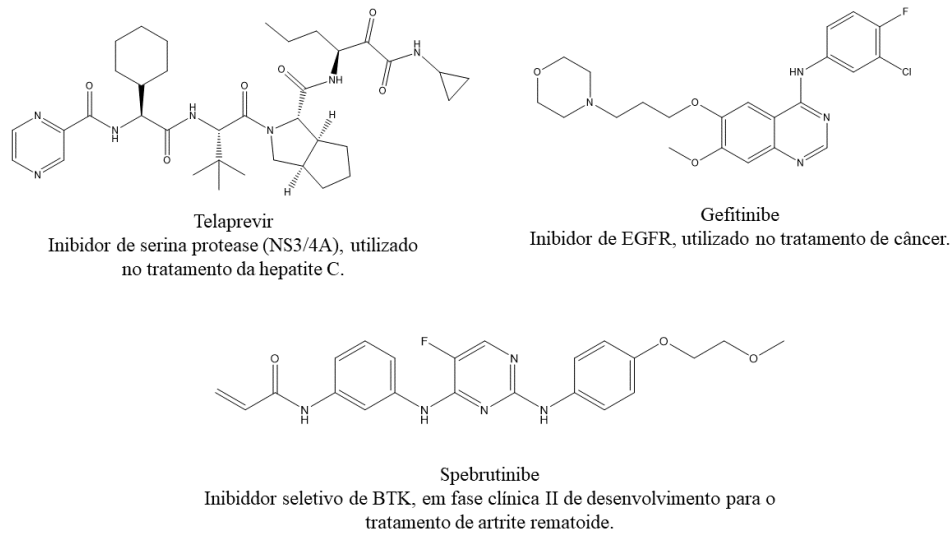
FONTE: PERLMUTTER, 1992 (ADAPTADO).

Figura 6 - Mecanismos covalentes de ligação direta entre molécula-receptor. (Nuc: corresponde sítio nucleofílico de uma proteína).



FONTE: SCHWÖBEL et al., 2011

**Figura 7 – Fármacos inibidores covalente de sucesso.**



FONTE: AUTORA, 2022.

## 2.4 - Reposicionamento de Fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo medicamento envolve diversas etapas complexas, elevado tempo e alto custo econômico (em torno US\$ 2.5 bilhões), com taxa de sucesso menor que 10% (ROESSLER et al., 2021). No decorrer do desenvolvimento, cada fármaco precisa ter sua eficácia e segurança comprovadas em determinados grupos de pessoas, em diversas faixas etárias e em situações fisiopatológicas (REIS, 2020). Trata-se de um trajeto longo que leva entre 10 a 17 anos para que a população tenha acesso ao medicamento regulamentado. Entre um período de 2 a 3 anos são necessários para a descoberta do alvo terapêutico, análise e validações; Após este passo delineado, entre 0.5 a 1 ano são selecionados protótipos de fármacos com atividade biológica e mais 1 a 3 anos para dar seguimento a otimização deles; Posteriormente é realizada a etapa de determinação das propriedades farmacocinéticas e exposição sistêmica (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade - ADMET) que pode levar mais 1 a 2 anos. Comprovações de eficácia em ensaios clínicos e avaliações de segurança ocorrem por volta de 5 a 6 anos; com os objetivos executados nas fases anteriores, são necessários de 1 a 2 anos para a obtenção do registro de aprovação regulatória e a inserção do lançamento no mercado (ASHBURN e THOR, 2004; FERNÁNDEZ-PRADA et al., 2019; SAHU et al., 2019).

Mesmo com os avanços tecnológicos, aperfeiçoamento de técnicas já existentes e com uma grande disponibilidade de informações sobre diversas doenças humanas, a produção de terapias medicamentosas tem sido muito lenta e não acompanha os elevados gastos. Como exemplo, utilizando a escala do custo em função do tempo necessário para o desenvolvimento de novos fármacos é possível verificar que para cada dólar gasto em pesquisa e desenvolvimento (P&D), estima-se que menos de um dólar de valor é devolvido em média (PUSHPAKOM et al., 2019). Isto é visto como algo negativo, tornando a indústria farmacêutica menos propensa a investimentos. Além deste problema de produtividade, existe uma pressão mundial sobre os preços, os desafios dos genéricos e maiores obstáculos regulamentares (ASHBURN e THOR, 2004; DIMASI e GRABOWSKI, 2016). Diante destes desafios, vem à luz a estratégia de reposicionamento de fármacos, a qual se encarrega de identificar novas utilizações e versões melhoradas de agentes terapêuticos conhecidos, descontinuados ou candidatos a fármacos (LANGEDIJK et al., 2015).

A abordagem de reposicionamento de fármacos pode ser aplicada em seis vias principais: 1) O fármaco pode ser testado em determinados ensaios clínicos e por acaso ser identificado como sendo eficaz para outras doenças, ou seja, redirecionamento baseado na serendipidade; 2) Detecção de nova atividade desempenhada por fármacos em uma outra enfermidade; 3) Reconhecimento de fármacos aprovados que inibem potencialmente um alvo biológico em uma outra doença; 4) Reposicionamento apoiado na revelação de uma nova função de uma proteína-alvo existente, sendo considerada um alvo importante em outra doença; 5) Uma mesma substância pode atuar em patologias distintas, isto é, redirecionamento baseado em uma rota comum em níveis metabólicos; 6) Reposicionamento relacionado a verificação de fármacos que apresentaram efeitos colaterais inesperados durante os ensaios clínicos, mas que apresentam bons resultados para outras enfermidades (LI e JONES, 2012; PARK, 2019).

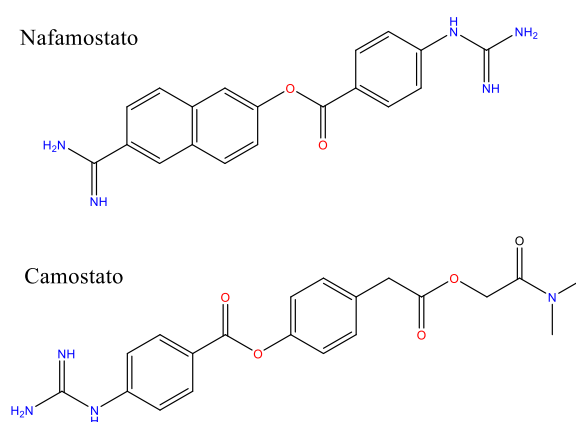
Uma das vantagens de se reposicionar um fármaco é a necessidade de apenas refazer as últimas etapas dos testes clínicos, tendo em consideração que as propriedades farmacocinéticas e parâmetros de segurança estão devidamente comprovados, evitando problemas de estabilidade e toxicidade. Além disto, estima-se que a execução dessa estratégia duraria cerca de 3 a 12 anos, onde o custo investido seria aproximadamente US\$ 300 milhões com taxa de sucesso entre 30-75% (NOSENGO, 2016; ROESSLER et al., 2021). Desde o início da pandemia da COVID-19, alguns fármacos têm sido utilizados em estudos de reposicionamento no intuito de combater a infecção do SARS-CoV-2. Exemplos a serem citados são os fármacos remdesivir, nafamostatato, camostatato, baricitinib, molnupiravir e outros. Todos estes estão sendo

estudados nos Estados Unidos, Europa e Japão (HUGHES, 2021; DE SAVI et al., 2020; TIAN et al., 2021).

## 2.5 - Fármacos de referência para o presente trabalho

Em nossos estudos de triagem virtual usamos como fármacos de referência o nafamostato e o camostato (Figura 8) para fins comparativos, pois se tratam de inibidores conhecidos de serina protease (YAMAMOTO et al., 2016; ZHOU et al., 2015). Ambos os fármacos foram aprovados pelas agências reguladoras do Japão para o tratamento da pancreatite crônica e também utilizados no tratamento de outras doenças que formam coágulos sanguíneos (DE SAVI, HUGHES e KVAERNO, 2020; CHOUDHRY et al., 2020; MARUYAMA et al., 2011; AL-HORANID e DESAI, 2014). Em pesquisa recente, foi descoberto que o nafamostato possui eficácia na inibição da infecção por SARS-CoV-2 em culturas de células humanas pulmonares (Calu-3), dentre um conjunto de fármacos utilizados em testes *in vitro* aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) (KO et al., 2021). Por sua vez, conforme os estudos de Hoffmann et al. (2020), o camostato foi capaz de inibir a TMPRSS2, impedindo efetivamente a entrada do SARS-CoV-2 dentro de células epiteliais (Caco-2) em testes *in vitro* também. Atualmente, os dois fármacos se encontram sob estudos de fase clínica para o tratamento da COVID-19 (CLINICAL TRIALS.GOV, 2021; ZHURAVEL, 2021).

**Figura 8 – Estruturas dos fármacos nafamostato e camostato, respectivamente.**



FONTE: AUTORA, 2022.

É importante salientar que a literatura reporta diferentes efeitos adversos para os dois fármacos citados. Um estudo informa que o nafamostato e seus metabólitos PGBA (p-guanidinobenzoic acid ou ácido p-guanidinobenzóico) e NA (6-amidino-2-naphthol ou 6-amidino-2-naftol) podem inibir a condução de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) sensível a amilorida nos sistemas de ductos coletores renais resultando na inibição da secreção de íons potássio ( $\text{K}^+$ ), podendo ocasionar hipercalemia (HIFUMI et al., 2020; MUTO et al., 1994). Também foi relatado que o uso do nafamostato pode causar parada cardíaca em pacientes que recebem diálise por causa de mudanças repentinas no estado de saúde deles (KIM et al., 2016). Enquanto o camostato, a literatura atribui como efeitos adversos comuns erupção cutânea, prurido, náusea, diarreia e modificações de valores em testes laboratoriais (ONO PHARMACEUTICAL, 2009). Apesar destes efeitos adversos mencionados, os dois fármacos são bem tolerados e têm tempo de meia vida curta (CHOI et al., 2015; DE SAVI, HUGHES e KVAERNO, 2020; MIDGLEY et al., 1994).

## 2.6 – Modelagem molecular

A criação de modelos permite manipular e analisar profundamente objetos e fenômenos físicos reais. Com avanços na área da computação e desenvolvimento de novos métodos na área de química computacional, a modelagem molecular passou a ser um conjunto de ferramentas valiosas para representação, edição e visualização de sistemas químicos complexos, além de ser também utilizada para uma melhor interpretação de resultados experimentais (LEACH, 2001; COMBA, HAMBLEY e MARTIN, 2009).

Auxiliada por computadores, a modelagem molecular tem como instrumento matemático regente o cálculo teórico para realizar avaliações e simulações das propriedades e do comportamento de átomos, moléculas, sólidos, gases, líquidos e soluções (DE OLIVEIRA, 2018). São efetuados cálculos de energias conformacionais, de propriedades termodinâmicas, de orbitais moleculares e estatísticos que ajudam no entendimento das relações entre estrutura e atividade biológica, na exploração de características de reconhecimento molecular, na formulação de hipóteses que levam ao planejamento e síntese de novos fármacos ligantes (ANDREI et al., 2012).

Para os estudos de modelagem molecular são utilizados métodos clássicos, que compreende a mecânica e dinâmica molecular, métodos quânticos, que inclui os métodos *ab initio*, semiempíricos, teoria do funcional de densidade e análise populacional, e também



métodos comparativos, como é o caso da modelagem de proteínas por homologia (SANT'ANNA, 2009). A escolha de cada um desses métodos depende de qual informação se quer obter, da capacidade computacional e da precisão requerida para a concretização dos cálculos (SANT'ANNA, 2009; BARREIRO e FRAGA, 2015)

### 2.6.1 – Modelagem por homologia

A modelagem por homologia, também conhecida como modelagem comparativa, é uma ferramenta computacional valiosa com a finalidade de prever estruturas tridimensionais de proteínas e enzimas a partir das sequências de aminoácidos (estruturas primárias). A descoberta de um fármaco pode atingir o sucesso por meio do conhecimento acerca da disponibilidade e maior quantidade de informações da ordem estrutural do receptor biológico. Apesar dos avanços tecnológicos no que diz respeito aos métodos de determinação estrutural, implicando no número crescente de estruturas proteicas resolvidas experimentalmente ao longo dos anos, ainda assim há pouca ou nenhuma informação disponível sobre uma grande maioria dos biorreceptores tidos como alvos para novas alternativas terapêuticas. Geralmente, em coleções organizadas é possível encontrar estruturas primárias e tridimensionais por meio de diferentes bancos dados como, SRS, CATCH, GenBank, UniProt, BLAST, FastA, PDB, entre outros. Mas por diversas razões que envolve o processo de elucidação, o número de sequências primárias depositadas nos bancos de dados é maior do que o repositório de estruturas 3D (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Com isso, existe a necessidade de elaborar virtualmente estruturas de determinada macromolécula de interesse para a investigação e identificação de candidatos a fármacos.

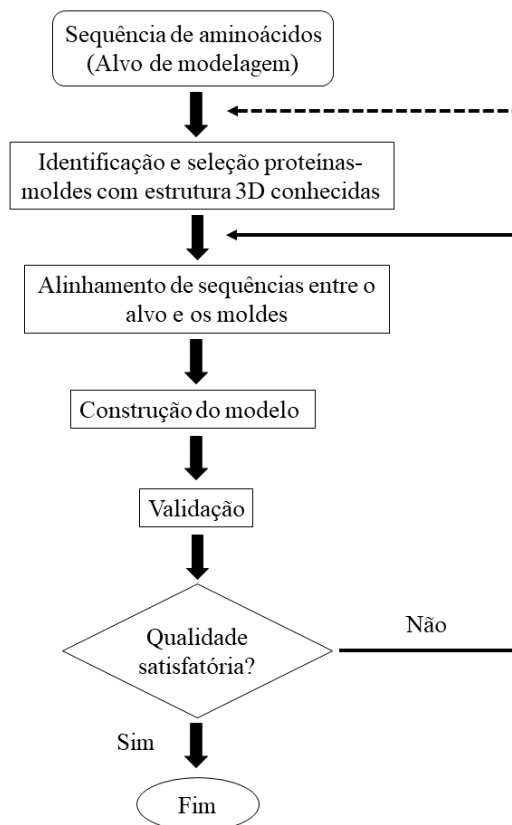
A estrutura tridimensional de uma proteína pode ser prevista pelo método *ab initio* ou pelo método com base em homologia. Geralmente este último é o mais aplicado, devido aos resultados serem mais próximos da realidade conformacional (RAMOS, 2007). Em nível molecular, alguns padrões gerais da modelagem por homologia têm fundamento no processo de evolução biológica (BRANDEM e TOOZE, 2012), o que implica que:

- a) A homologia entre as sequências de aminoácidos reflete em semelhança estrutural e funcional;
- b) Regiões internas em proteína homólogas são conservadas, tais como hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ ;

- c) Em regiões externas ocorrem diferenças estruturais entre proteínas homólogas, constituídas principalmente por alças (*loops*) que ligam os elementos de estruturas secundárias.

Com capacidade de gerar modelos satisfatórios, a modelagem por homologia possui quatro etapas sucessivas: (i) identificação e seleção de proteínas-molde, (ii) alinhamento das sequências de resíduos, (iii) construção das coordenadas do modelo e (iv) validação (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Um esquema geral do processo de modelagem comparativa pode ser observado na figura 9. Destaca-se que entre uma etapa e outra é utilizado um número significativo de métodos, programas e servidores específicos até a obtenção de um modelo homólogo adequado.

**Figura 9 – Fluxograma do processo geral da modelagem por homologia.**



FONTE: ORRY e ABAGYAN, 2012 (ADAPTADO).

(i) **Identificação e seleção de proteínas-molde**

Levando em consideração o conhecimento da estrutura, similaridade funcional, expressão gênica, similaridade sequencial e correlação evolutiva, o primeiro passo do método é identificar sequências de aminoácidos de proteínas resolvidas experimentalmente que possam estar correlacionadas de modo similar com a sequência alvo de interesse, cujas estruturas posteriormente são empregadas como moldes (DEANE e BLUNDELL, 2003). A busca das proteínas-moldes pode ser realizada utilizando-se algoritmos de alinhamento de servidores online como *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e o SWISS-MODEL, onde são selecionadas as proteínas com altos índices de similaridade, identidade, e cobertura sequencial entre os resíduos de aminoácidos, além de menores índices de *gaps* (lacunas) (MUNSAMY e SOLIMAN, 2017).

(ii) **Alinhamento das sequências de resíduos**

Após a identificação do molde, o próximo passo é a realização do alinhamento sequencial entre a proteína-alvo e a proteína-molde, conforme demonstrado na figura 10. O intuito desta etapa é procurar aspectos estruturais, como elementos de estruturas secundárias e resíduos catalíticos, correlacionando os resíduos estruturalmente equivalentes (SHARMA, WAKODE e KUMAR, 2021; SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Usualmente, é observado no processo a ocorrência de inserções e deleções que são localizadas nas regiões das alças, entre elementos estruturais secundários, como hélices e fitas. Com uma maior porcentagem de semelhança do que 30% de identidade sequencial entre a proteína-molde e a proteína-alvo, a literatura afirma que existe acurácia pronunciada para a execução da construção do modelo homólogo (LESK, 2008; MUNSAMY e SOLIMAN, 2017). Os programas mais usados para esta etapa são BLAST, FASTA, CLUSTAL, e o MULTALIN, sendo disponibilizados como servidores online na internet.

**Figura 10 – Exemplo de alinhamento entre o receptor alvo quimiocina tipo 5 (CCR5) e o molde (1F88). Regiões marcadas com quadrados vermelhos indicam que os resíduos conhecidos estão conservados. O programa CLUSTAL foi utilizado para o alinhamento.**

```

sp|P51681|CCR5_HUMAN      MDYQVSSPIYDINYYS-----EPCQKINVKQIAARLLPPLYSLVFIFGFVGNMLVIL 53
sp|P02699|OPSD_BOVIN     MNGTEGPNFYVPPFSNKTGVVRSPPFEAPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLIMLGFPINFLTLY 60
*:. .:* .: .: * .: .: * .: .: * .: .: * .: .: * .: .: * .: .:

sp|P51681|CCR5_HUMAN      ILINCKRLKSMTDIYLLNLAISSDLPFLLTPVFWAHYAAQ--WDFGNTMCQLLTGLYFIG 111
sp|P02699|OPSD_BOVIN     VTVQHKLRTPLNLYILNLAVADLFMVFGGFTTTLTSLHGYPVFGPTGCNLEGFFATLG 120
: : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

sp|P51681|CCR5_HUMAN      FFSGIFFIILLTIDRYLAVVHAVFALKARTVTFGVVTSVITWVAVFASLEGGII-FTRSQ 170
sp|P02699|OPSD_BOVIN     GEIALWSLVVLAIERYVVVCKPMSNFRFG-ENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLVGWSRYI 179
.: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|P51681|CCR5_HUMAN      KEGLHYTCSSHPYSQYQFWKNFQTLKIVILGLVLPFLVMVICYSGLKTLRLCRNE--- 227
sp|P02699|OPSD_BOVIN     PEGMQCSCGIDYYPHEETNNESEFVIYMFVVFHFIIDPLIVIFPCYGLVFTVKEAAAQQQE 239
* : : * . : : . : : . : : . : : . : : . : : . : : . : : . : : . : : . : :

sp|P51681|CCR5_HUMAN      -----KKRHRVRLIFTIMIVYFLRWAPYINIVLLNTFQEPFFGLNCCSSNRLDQAMQVT 282
sp|P02699|OPSD_BOVIN     SATQKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWLPYAGVAFY-----IFTHQGSDFGPIFMTIP 291
* . . . . . * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

sp|P51681|CCR5_HUMAN      ETLGMTHCCINPIIYAFVGEKFRNYLLVFFQKHIKRPFCKCCSIFQQEAPERASSVYTRS 342
sp|P02699|OPSD_BOVIN     AFFAKTSAVYNPVVIYIMNKRFRNCMVTTL-----CCGKNPLGDDEASTTVSKTE 341
. . * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

sp|P51681|CCR5_HUMAN      TGEQEISVGL 352
sp|P02699|OPSD_BOVIN     TSQVAPA--- 348
* . : :

```

FONTE: SHAHLAEI et al., 2011.

### (iii) Construção das coordenadas do modelo

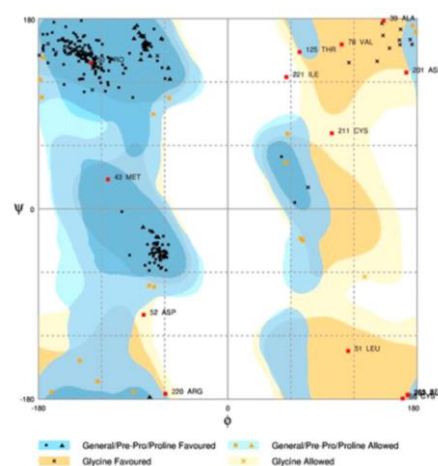
A partir do procedimento de alinhamento sequencial, o modelo tridimensional da proteína-alvo é gerado através de algoritmos específicos que transfere as informações retiradas da estrutura 3D da proteína-molde para o modelo homólogo. Os métodos mais utilizados para regiões estruturalmente conservadas são a modelagem pela união de corpos rígidos (*modeling by rigid-body assembly*) e a modelagem pela satisfação de restrições espaciais (*modeling by satisfaction of spatial restraints*). O primeiro método constrói o modelo por parte, tendo como parâmetro a conservação estrutural entre proteínas homólogas com alto grau de identidade. Em adição, é considerada a média das posições dos  $C\alpha$  das seqüências de aminoácidos das regiões estruturalmente conservadas. As regiões que não possuem critérios satisfatório são denominadas de regiões variáveis, em que usualmente compreendem porções de alças que conectam as regiões conservadas (SAXENA et al., 2013; MUNSAMY e SOLIMAN, 2017). Já o segundo método constrói o modelo utilizando restrições espaciais por meio do alinhamento entre seqüências alvo e molde, extraído do molde suas restrições espaciais (distâncias e ângulos) e transferindo-as para o modelo homólogo. Além disso, tanto o tamanho das ligações quanto os ângulos preferenciais são obtidos usando campo de força,

delimitando dessa maneira o número de conformações que o modelo pode expressar (SAXENA et al., 2013). *Workspaces* que utilizam esses dois métodos são o SWISS-MODEL e o MODELLER, respectivamente.

(iv) **Validação**

Logo após a construção do modelo é preciso avaliar a qualidade dele. Nesta última etapa são averiguados os ângulos torcionais, os ângulos entre as ligações, o comprimento entre as ligações, as ligações peptídicas, a planaridade dos anéis de cadeias laterais e a quiralidade dos aminoácidos (JOHNSON 1994; SILVEIRA, 2005). Se o modelo for descrito com uma qualidade ruim, todo o processo anterior deve ser refeito, melhorando o alinhamento sequencial ou buscando outras metodologias de modelagem por homologia. Vários programas podem ser encarregados de analisar o modelo gerado, como Procheck, Whatif, MolProbity e Verify3D. Em particular, o gráfico de Ramachandran (figura 11), obtido por diversas aplicações, é um dado de validação muito importante. Nele tem-se a definição dos resíduos de aminoácidos que se encontram em regiões energeticamente favoráveis e desfavoráveis, apresentando uma plotagem da distribuição de combinações entre os ângulos  $\Phi$  e  $\Psi$  (RAMACHANDRAN e SASISEKHARAN, 1968).

**Figura 11 - Gráfico de Ramachandran do modelo da proteína homeobox Hox-B13. Neste exemplo, quase 89% dos resíduos de aminoácidos na proteína modelada ocupam regiões favoráveis, 6,4% dos resíduos ocupam regiões permitidas, e os 5% restantes ocupam a região não favorável, respectivamente.**



FONTE: CHANDRASEKARAN et al., 2017.

### 2.6.2 – Estratégia *Structure-Based Virtual Screening* (SBVS)

A triagem virtual (TV) é um termo que surgiu no final dos anos 1990 para designar técnicas que utilizam métodos computacionais para a seleção de compostos em bancos de dados, de modo a identificar os ligantes de alvos terapêuticos mais promissores (LI e SHAH, 2017; LAVECCHIA e DI GIOVANNI, 2013). As técnicas de TV são relevantes, pois podem ser usadas em conjunto com a triagem fenotípica em larga escala na indústria farmacêutica, em pequenas empresas de biotecnologia e nos laboratórios acadêmicos (LEACH e GILLET, 2007; LI e SHAH, 2017). Em geral, as estratégias de TV podem ser classificadas em triagem virtual baseada nos ligantes (em inglês, *ligand-based virtual screening* - LBVS) e triagem virtual baseada na estrutura do receptor (em inglês, *structure-based virtual screening* - SBVS).

Na abordagem LBVS há uma dependência na aplicação computacional de descritores de estruturas moleculares, propriedades farmacológicas, características do farmacóforo e nas análises de relações entre o banco de dados e moléculas ativas que foram para testes biológicos, nas quais podem funcionar como moldes devido à similaridade química, incluindo também estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (ou *quantitative structure-activity relationship* - QSAR) e estudos de correspondência de forma 3D (STAHURA e BAJORATH, 2005; RODRIGUES et al., 2012). O protocolo do método LBVS é usualmente requerido quando a estrutura tridimensional do alvo biológico é desconhecida ou quando não é possível prever o receptor por métodos de modelagem por homologia (BANEGAS-LUNA, CERÓN-CARRASCO e PÉREZ-SÁNCHEZ, 2018). Em contrapartida, a abordagem SBVS utiliza a estrutura tridimensional do alvo biológico determinada experimentalmente (por cristalografia de raio X, ressonância magnética nuclear ou prevista a partir de um modelo construído por meio de proteínas homólogas de identidade considerável) para desenvolver os cálculos de ancoragem de uma seleção de ligantes potenciais e classificá-los com base na sua predição de afinidade de ligação ou complementaridade com o sítio de ligação (LIONTA et al., 2014; LAVECCHIA e DI GIOVANNI, 2013).

Por este ponto de vista, a técnica SBVS tem como foco central o *docking molecular* (ou ancoragem molecular), onde os cálculos matemáticos intrínsecos predizem a melhor orientação e conformação do ligante no sítio ativo do receptor biológico baseado na estabilidade energética do complexo formado (CHENG et al., 2012). O protocolo de docking possui a combinação de dois componentes complementares que são o algoritmo de pesquisa e a função de pontuação. Os algoritmos de pesquisa examinam o local da proteína-alvo em que o composto irá se ligar, fornecendo possíveis orientações específicas chamadas de poses de ligação (BITENCOURT-

FERREIRA e DE AZEVEDO, 2019; KOLODZIK, SCHNEIDER e RAREY, 2018). Eles podem ser classificados em três categorias:

- Algoritmos Sistemáticos - exploram todos os graus de liberdade das moléculas-ligantes em fragmentação (MAIA et al., 2020);
- Algoritmos determinísticos - possuem o mesmo comportamento para diferentes formas de execução. Dado entrada de um estado inicial específico, sempre haverá o mesmo resultado de saída (GUEDES et al., 2014);
- Algoritmos estocásticos - envolvem movimentações aleatórias em relação aos graus de liberdade, implicando na obtenção de resultados distintos como saída para um mesmo estado inicial de entrada (KOLODZIK, SCHNEIDER e RAREY, 2018).

Por outro lado, as funções de pontuação são aplicadas para previsão do modo de ligação entre o ligante e a proteína-alvo, ranquear afinidade relativa e estimar a energia livre de ligação absoluta (SOTRIFFER, 2016; STAHL, 2000). As funções de pontuação podem ser classificadas em três tipo:

- Baseadas em campo de força - utilizam uma soma de termos clássicos de campo de força molecular, em que a sua parametrização pode ser feita com dados experimentais, providos de cálculos quânticos ou até mesmo pela combinação de ambos (KOLODZIK, SCHNEIDER e RAREY, 2018; GUEDES et al., 2014). Exemplos: D-Score, G-Score, GoldScore;
- Empíricas – possuem fundamento na descrição coletiva da aproximação da energia livre de ligação, podendo ser associada ao somatório de variáveis não correlacionadas (STAHL, 2000; GUEDES et al., 2014). Exemplos: ChemScore, X-Score, GlideScore, Fresno;
- Baseadas em conhecimento - baseiam-se em análises estatísticas das interações e distâncias comuns empregadas nos estudos de predição de proteínas, dependendo de potenciais atômicos em pares calculados (KOLODZIK, SCHNEIDER e RAREY, 2018; MAIA et al., 2020). Exemplos: DrugScore, PMF, RF-Score, SMOG score.

Com o surgimento do primeiro trabalho de ancoragem molecular no início dos anos 1980, muitas ferramentas de docking foram desenvolvidas como o Autodock, GOLD, Glide, FlexX, ICM, DockThor, dentre outros (KUNTZ et al., 1982; SOUSA et al., 2006; MOITESSIER et al., 2008; TORRES et al., 2019). Entretanto, deve-se destacar que algumas

destas ferramentas performam melhor em determinados casos e outras não, o que implica as vezes em resultados falso-positivos e falso-negativos (LIONTA et al., 2014). Dessa maneira, é preciso ter consciência que não há um único programa computacional que fará previsões precisas da classificação e posição de ligação de compostos no sítio ativo devido à dificuldade de parametrização da complexidade das interações vinculantes entre ligante e receptor. Apesar desta limitação, existem várias vantagens e uma delas reflete na diminuição do tempo e no custo envolvidos na triagem de milhões de pequenas moléculas (MAIA et al., 2020). Com a estratégia SBVS vários grupos de pesquisa ao redor do mundo têm tido sucesso, sendo capazes de identificar e otimizar *hits* ou compostos líderes, assim como ter auxílio no entendimento de dados experimentais a partir de modelos efetuados (PASSOS et al., 2020; BRAGA et al., 2019; DE MOURA et al., 2020; FARIAS et al., 2021).

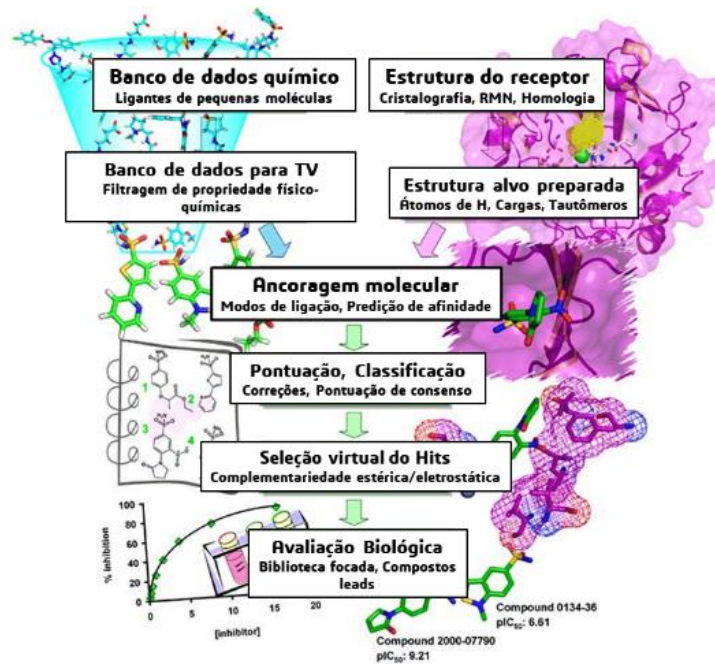
De modo geral, a aplicação da estratégia SBVS requer prudência durante a sua aplicação em um estudo. Inicialmente, os ligantes a serem ancorados no receptor biológico precisam passar por uma preparação que exige o cálculo de cargas atômicas e a representação correta de estereoisômeros, tautômeros e estados de protonação (FERREIRA, GLAUCIUS e ANDRICOPULO, 2011). Esses ligantes podem ser obtidos através de bancos de dados públicos ou comerciais, tais como PubChem, ChEMBL, ZINC, ChemSpider, Drugbank e outros. Também, estes podem ser elaborados partindo-se do conhecimento de propriedades farmacológicas desejadas, consistindo no método computacional *De novo drug design* (LI e SHAH, 2017; SURYANARAYANAN et al., 2018; CHENG et al., 2012). Sob outra perspectiva, a preparação de alvos biológicos tridimensionais a serem usados nos estudos de docking inclui fatores importantes como a seleção do modelo, a definição do estado de protonação dos resíduos de aminoácidos e a presença de moléculas de água na cavidade do sítio de ligação (LIAO et al., 2013). Geralmente, os alvos receptores são obtidos no banco de dados *Protein Data Bank (PDB)*, onde estão depositadas diversas estruturas, na qual a escolha deve considerar a resolução e flexibilidade do modelo tridimensional, bem como a presença de ligante e as variações conformacionais (FERREIRA, GLAUCIUS e ANDRICOPULO, 2011).

Após a preparação dos ligantes e a seleção da estrutura receptora, a ancoragem molecular pode ser realizada com cada molécula da biblioteca química, e então será obtido valores de pontuação e classificação de docking. Posteriormente, um pequeno conjunto de compostos com melhores pontuações irá para a etapa de avaliação experimental, conforme mostrado no fluxograma da figura 12. É importante frisar que a sequência de trabalho pode ter variações para requisitos específicos do estudo que se deseja realizar, incorporando filtros de



classificação, de pose, de interações intermoleculares e de complementariedade multifuncional, para o aumento das taxas de sucesso, adicionando pontuação consensual e outros.

**Figura 12 - Etapas computacionais na SBVS, ilustrados pela identificação de uma nova classe de inibidores de anidrase carbônica.**



FONTE: ANDRICOPULO et al., 2009 (ADAPTADO).

Em face do que foi exposto anteriormente, neste trabalho utilizamos a estratégia de reposicionamento de fármacos e a metodologia de SBVS no intuito de identificar fármacos aceptores de Michael como alternativas terapêuticas econômicas para o tratamento de pacientes com COVID-19.

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral

Usar a estratégia de Triagem Virtual Baseada na Estrutura do Receptor (*Structure-based virtual screening - SBVS*) para o reposicionamento de fármacos caracterizados como Aceptores de Michael no combate à COVID-19.

#### 3.2 - Objetivos específicos

- Realizar a elucidação do melhor modelo tridimensional da enzima TMPRSS2, procedente na identidade e estabilidade através da sequência-alvo depositada no banco de dados da NCBI;
- Buscar em bancos de dados fármacos que se caracterizem como aceptores de Michael;
- Desenhar e realizar a minimização estrutural dos fármacos selecionados;
- Validar o protocolo virtual de docking e escolher o melhor algoritmo do software GOLD, com o auxílio de técnicas como re-docking, RMSD e mapa de calor;
- Realizar as etapas de ancoragem molecular, com inspeção visual e obtenção dos valores de fitscore;
- Selecionar os melhores compostos classificados pelos filtros “média dos valores de fitscores maiores ou iguais aos dos fármacos de referência (Nafamostato e Camostato)”, “distância menor ou igual a 3,4 Å entre o grupo -OH do resíduo Ser441 e os carbonos eletrofílicos das moléculas”, e "interações com os três resíduos catalíticos essenciais (Ser441, His296 e Asp345)”.
- Realizar cálculos de docking covalente com os melhores fármacos classificados pelos filtros.

## 4 - MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 - Materiais

- Notebook Dell® (Texas, USA), modelo Latitude 3470, com processador Intel® Core™ i3-6100U, CPU 2.30 GHz, 8 GB RAM, performando no sistema operacional Windows® 7 professional (Redmond, USA).
- Workstation VMware 15.5.6, Ubuntu (V.18.04.5) com sistema operacional Linux, instalado no notebook Acer® Aspire series E1 (Taiwan, China), modelo V5WE2, com processador Intel® Core™ i5-4200U, CPU 1.60 GHz, 4 GB RAM, performando no sistema operacional Windows® 10 professional (Redmond, USA).

### Softwares utilizados

- ArgusLab (V.4.0.1)
- ChemDraw Professional (V.16.0.1.4)
- MOPAC (V.2016)
- GOLD (V.5.8.0)
- PyMol (V.2.4.0)
- Discovery Studio (V.20.1)
- Chimera (V.1.14)
- Excel (V. 16.0.5)
- AutoDock 4 (V.4.2.6)

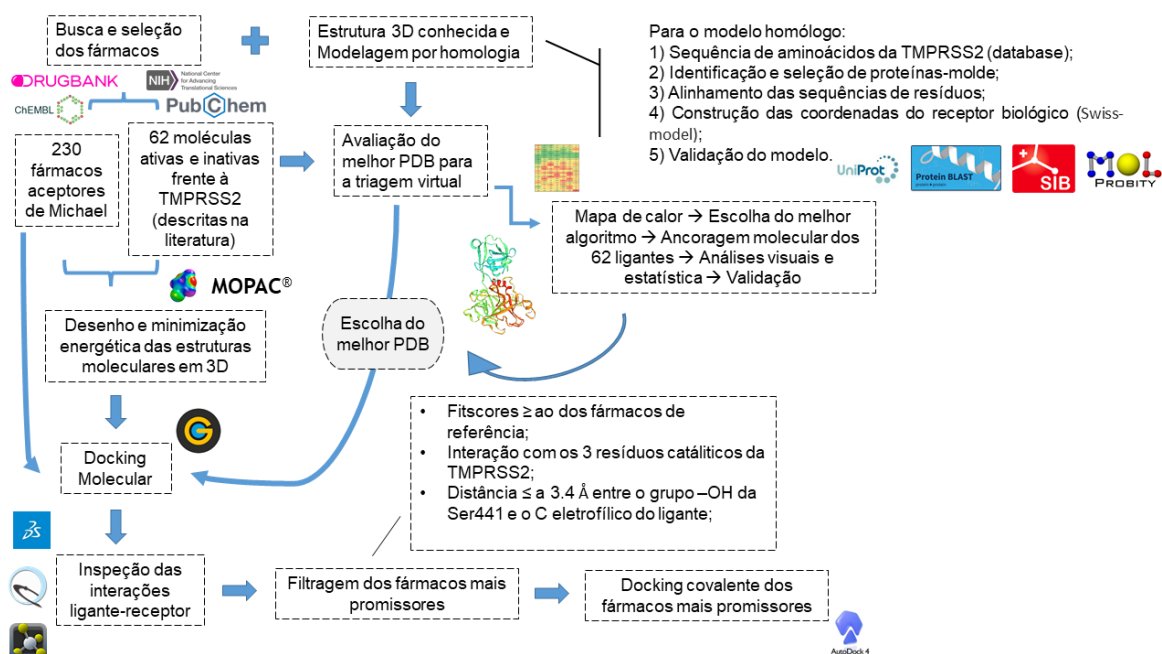
### Servidores online

- Browser NIH Chemical Genomics Center – NCGC (<https://tripod.nih.gov/npc/>)
- Pharmaceutical Collection – NPC (<https://ncats.nih.gov/expertise/preclinical/npc>)
- DrugBank([https://go.drugbank.com/structures/search/small\\_molecule\\_drugs/structure](https://go.drugbank.com/structures/search/small_molecule_drugs/structure))
- ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/advancedSearchForward.do>)
- National Center for Biotechnology Information – NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

- UniProt (<https://www.uniprot.org/>)
- SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)
- Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/index.php>)
- Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>)

Os estudos de modelagem molecular foram desenvolvidos por meio de acesso remoto em estações computacionais do Núcleo de Análise e Pesquisas em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN), situado no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Encontra-se esquematizado na figura 13 o modo geral dos métodos utilizados nos passos descritos adiante.

**Figura 13 – Esquema geral da metodologia adotada para o alcance dos objetivos do presente trabalho.**



FONTE: AUTORA, 2021.

## 4.2 - Seleção das estruturas dos fármacos

A busca dos ligantes para os estudos de triagem virtual foi realizada em bancos de estruturas de compostos disponíveis através dos portais online *NIH Chemical Genomics Center (NCGC)*, *PubChem*, *Pharmaceutical Collection (NPC)*, *DrugBank* e *ChEMBL*. Utilizando um critério de seleção, escolheu-se fármacos aprovados pela FDA e substâncias sob investigação clínica que se comportam como aceptores de Michael, isto é, apresentam grupos eletrofílicos em suas estruturas. Dessa forma, foram selecionados 230 fármacos no total, sendo dois deles utilizados como referência para o presente trabalho (*Mesilato de Camostato* e *Mesilato de Nafamostato*).

## 4.3 - Minimização das estruturas dos fármacos

Após selecionar a lista de ligantes, as estruturas dos fármacos foram desenhadas utilizando os softwares *ArgusLab (V.4.0.1)* e *ChemDraw Professional (V.16.0.1.4)*, assim como a minimização das energias, empregando-se o campo de força *MM2 (Molecular Mechanics 2)* e os métodos semi-empíricos *Austin Model 1 (AM1)* e *Parametric Method 3 (PM3)*. Foi utilizado também o método *Parametric Method 7 (PM7)* no software *MOPAC (V.2016)* para moléculas com maiores gradientes de cálculos.

## 4.4 - Estrutura 3D e modelagem por homologia do alvo TMPRSS2

A estrutura tridimensional da *TMPRSS2* não havia sido resolvida experimentalmente e depositada no site do *Protein Data Bank* até o dia 21 de abril de 2021, sendo esta uma data posterior ao início do desenvolvimento da pesquisa. Então, construímos o seu modelo por homologia. Com isso, foram conduzidas as seguintes etapas:

### (1) Identificação e seleção da enzima-molde

Inicialmente, pesquisou-se a sequência de aminoácidos da *TMPRSS2*, obtendo-se em formato *FASTA* a sequência da *serina protease transmembranar isoforma 2 [Homo sapiens]* no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*; cujo código *UniProt* é *O15393*. Em seguida, esta sequência da enzima alvo foi submetida a pesquisa de estruturas no servidor automatizado *SWISS-MODEL*, e após o alinhamento

de sequências o repositório do servidor forneceu diversos moldes. Entretanto, foi escolhido aquele que apresentou um bom critério de precisão e cobertura da sequência alvo, sendo este o molde da proteína homóloga *serina protease hepsina (5ce1.1A)* como o de melhor qualidade.

## **(2) Alinhamento das sequências**

A partir da correlação enzima-alvo e proteína-molde alcançada na etapa 1, foi necessário realizar um alinhamento *pairwise* sequencial entre os resíduos de aminoácidos. Para isto, utilizou-se como ferramenta o servidor *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* e Clustal Omega.

## **(3) Construção do modelo**

Após verificar que os resíduos de interesse estavam conservados na sequência de aminoácidos da proteína-molde *5ce1.1A* na etapa anterior, construiu-se o modelo homólogo pelo SWISS-MODEL.

## **(4) Avaliação do modelo**

Para este último passo, o modelo construído foi avaliado pelo valor de *root-mean-square deviation (RMSD)* e também pelo gráfico de Ramachandran, este último gerado pelo servidor online MolProbity. Duas observações podem ser destacadas: I- A enzima homóloga construída não possui ligante complexado; II- Posteriormente, foi feito o download do pdb resolvido experimentalmente no site *Protein Data Bank*, cujo o código é 7MEQ. Com ele resolveu-se trabalhar a etapa seguinte.

## **4.5 - Validação do processo de ancoragem molecular**

Com a resolução experimental da estrutura 3D do alvo Tmprss2, resolveu-se elaborar um banco de dados contendo 62 moléculas descritas na literatura como inibidores e não inibidores frente à enzima de interesse com intuito de verificar qual dos pdbs seria adequado para ser utilizado adiante. Foi realizado inicialmente o processo de re-docking com o pdb

7MEQ, o qual consiste na comparação da posição do ligante cristalizado com a posição do ligante redocado no mesmo sítio ativo do alvo biológico, de modo a verificar se o modelo *in silico* é capaz de prever a orientação espacial do ligante e as interações com resíduos de aminoácidos relevantes para a atividade biológica.

Dessa forma, carregou-se no software GOLD (V.5.8.0) o arquivo .pdb da enzima (7MEQ), submetendo-a a alterações em sua estrutura. O ligante principal presente no arquivo foi extraído, foram deletadas moléculas de água remanescentes e adicionados hidrogênios à estrutura biológica. Em seguida, foi selecionado na aba “*Define Binding Site*” a opção “*One or more ligands*” e definiu-se o mesmo local de ligação do ligante complexado na enzima em um grid box de 10 Å. Em seguida foi adicionado na enzima o ligante ácido 4-carbamimidamidobenzóico com a sua conformação experimental, obtido no portal online Protein Data Bank. Na aba “*Fitness & Search Options*”, foram selecionados por vez os algoritmos CHEMPLP, GoldScore, Chemscore e ASP na seção “*Scoring Function*”, não selecionando a opção “*Allow early termination*” com o objetivo de gerar um maior número de soluções. Já na opção “*GA Settings*”, selecionou-se 200% na barra “*Search efficiency*” e marcada a caixa “*Max ops*” para seleção de um maior número de operações. Logo após, foi escolhida a pasta onde foram salvos os resultados do ensaio de docking e iniciou-se os cálculos. Depois de alguns minutos com o ensaio finalizado, visualizou-se as dez soluções geradas pelo software e salvou-se em formato .pdb aquelas que obtiveram o maior valor de fitscore para cada algoritmo selecionado.

Posteriormente, foi realizado no software PyMol (V.2.4.0) o alinhamento dos ligantes ancorados com o ligante experimental da proteína, obtendo-se assim os valores de RMSD para os 4 algoritmos disponíveis no GOLD (V.5.8.0). Após a etapa anterior, foi elaborado um mapa de calor no Excel com todos os valores de RMSD para cada algoritmo, e por fim foi escolhido ChemScore, o algoritmo com o menor valor de RMSD para ser utilizado nos ensaios de ancoragem molecular das 62 moléculas do banco de dados. Utilizando os mesmos passos anteriores, foi realizada a ancoragem em triplicata destas moléculas no pdb 7MEQ, assim como no pdb homólogo para subsequente análise estatística. Sendo que para o pdb homólogo modificou-se a opção “*One or more ligands*” para a opção “*Atom*” e definiu-se o átomo OG do resíduo Ser441 como local de ligação, devido não haver ligante complexado em sua estrutura.

#### 4.6 - Ancoragem molecular

Após a realização dos procedimentos anteriores e escolha do pdb adequado para a realização do trabalho, os 230 fármacos selecionados foram submetidos à ancoragem molecular no modo semirrígido conforme as mesmas configurações da metodologia descrita anteriormente, utilizando-se a função de pontuação GoldScore para os cálculos. Todas as poses obtidas para cada molécula foram aquelas com maior valor de pontuação gerado, estas posteriormente foram analisadas com os softwares Discovery Studio (V.20.1), PyMol (V.2.4.0) e Chimera (V.1.14), verificando-se assim as interações correspondentes de interesse para a pesquisa. Após a inspeção visual, foi determinado quais fármacos seguiriam para os cálculos de docking covalente através da média dos valores de fitscores maiores ou iguais aos dos fármacos de referência, e utilizando como filtro, a distância menor ou igual a 3,4 Å entre o grupo -OH do resíduo Ser441 e os carbonos eletrofílicos das moléculas, além das interações com os três resíduos catalíticos - Ser441, His296 e Asp345.

#### 4.7 - Docking covalente

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se o método de Bianco et al. (2016) para os cálculos de docking covalente, sendo o software AutoDock4 (V.4.2.6) executado nos procedimentos em sistema operacional Linux.

A princípio, adicionou-se hidrogênios ao arquivo .pdb da proteína selecionada no programa PyMol (V.2.4.0). Para cada estrutura tridimensional dos fármacos, adicionou-se a ligação covalente do oxigênio do grupo -OH da serina e minimizou-se a energia dos arquivos .mol2 com o campo de força MM2. Modificando “= =” por “is” na primeira função vector do arquivo *prepareCovalent.py* e partindo de um conjunto de comandos, foi feito inicialmente um alinhamento dos ligantes com o receptor TMPRSS2, em que especificou-se a cadeia, tipo de resíduo de aminoácido (no nosso caso cadeia A:Ser441) e os índices de átomos no arquivo dos ligantes. Em seguida, gerou-se para a estrutura do receptor os arquivos padrão PDBQT para o programa onde ocorreu o alinhamento do ligante covalente. Também foram gerados arquivos PDBQT para os componentes rígidos e flexíveis usados para o docking, em que primeiro o receptor é processado para extrair a parte rígida (especificando qual resíduo será flexibilizado) e a mesma tarefa foi feita para o ligante processado. Logo após, gerou-se os arquivos de parâmetro para o cálculo real (.gpf e .dpf). O comando que gerou estes arquivos instrui o encaixe



do ligante covalente como um resíduo flexível e ignora qualquer ligante como tido “*verdadeiro*”, mas para isso precisou-se criar um arquivo vazio.

Além disso, o arquivo .dpf foi editado para definir o modelo de energia apropriado para que a pontuação de encaixe correspondesse à interação entre o resíduo flexível (o ligante) e o receptor rígido, bem como uma parametrização melhor para os átomos (para isso, a entrada: “*unbound\_model extended*” foi substituída por “*unbound\_energy  $\theta.\theta$* ” e a entrada “*autodock\_parameter\_version 4.2*” por “*parameter\_file AD4\_parameters.dat*”. Em adição, editou-se manualmente o arquivo .gpf, substituindo somente a entrada “*autodock\_parameter\_version 4.2*” por “*parameter\_file AD4\_parameters.dat*”. Por fim, o programa foi executado por outro conjunto de comandos e gerou-se depois de alguns minutos o arquivo .dlg contendo os resultados de cálculos.

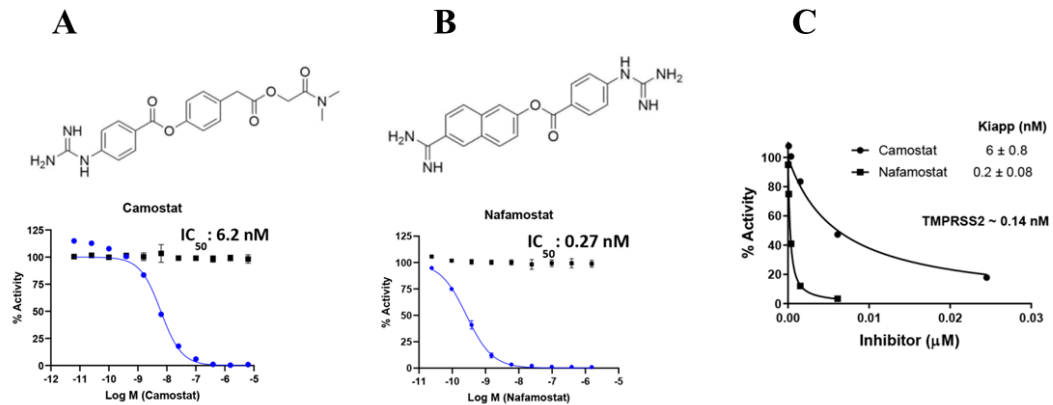
## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção encontram-se apresentados e discutidos os resultados sobre a busca e minimização das estruturas dos fármacos (ligantes) obtidos nos bancos de dados, modelagem por homologia e estrutura tridimensional da enzima TMPRSS2, validação do protocolo virtual de docking, ancoragem molecular e, por fim, docking covalente.

### 5.1 - Escolha dos fármacos de referência

Com finalidade de comparar os resultados obtidos com algum composto inibidor de TMPRSS2 conhecido, foram escolhidos como referências os fármacos nafamostato (ou Mesilato de Nafamostato) e camostato (ou Mesilato de Camostato). Tanto o nafamostato quanto o camostato tiveram destaques positivos após reduzir a infecção causada pelo SARS-CoV-2 em células hospedeiras em testes *in vitro* (Hu et al., 2021; Cannalire et al., 2020; KAUR et al., 2021). O estudo de *Shrimp et al. (2020)* reporta que a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para o camostato e para o nafamostato foi de 6,2 nM e 0,27 nM, respectivamente (Figura 14A e 14B). Esse mesmo estudo também relata que para o camostato, a constante de dissociação aparente ( $K_i^{app}$ ) para o complexo TMPRSS2-inibidor foi igual a  $6 \pm 0,8$ ; enquanto para o nafamostato, o  $K_i^{app}$  foi igual a  $0,2 \pm 0,08$  (Figura 14C). Esses dados revelam que há alta afinidade destes fármacos com a enzima, de modo que a inibição da entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira é causado pela inibição direta da TMPRSS2. Assim, os dois fármacos mencionados são úteis para serem utilizados como modelos na busca e no design de novos inibidores de TMPRSS2.

**Figura 14 – Estruturas moleculares, concentração inibitória média  $IC_{50}$  em azul e ensaio enzimático em preto pelo (A) camostatato e (B) nafamostatato. No gráfico em (C) encontra-se a concentração de TMPRSS2 ativa calculada e as constantes de dissociação aparente  $K_i^{app}$  ajustadas pela equação de Morrison para os fármacos camostatato e nafamostatato.**

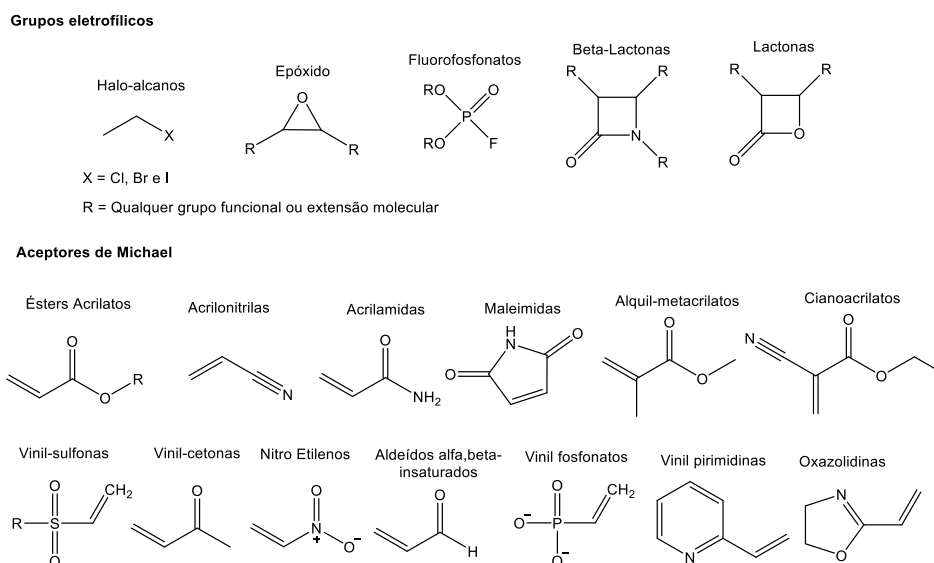


FONTE: SHRIMP et al., 2020 (ADAPTADO).

## 5.2 - Planejamento dos fármacos (ligantes)

A seleção dos 230 fármacos para o estudo de triagem virtual foi fundamentada na hipótese de que as moléculas devem se comportar como aceptores de Michael, os que podem se ligar de forma covalente e irreversível a enzima TMPRSS2, resultando na inibição deste alvo biológico. Na figura 15 abaixo encontram-se os diferentes grupos funcionais identificados como aceptores de Michael usados no trabalho (MATHER et al., 2006; DE CESCO et al., 2017; PERLMUTTER, 1992).

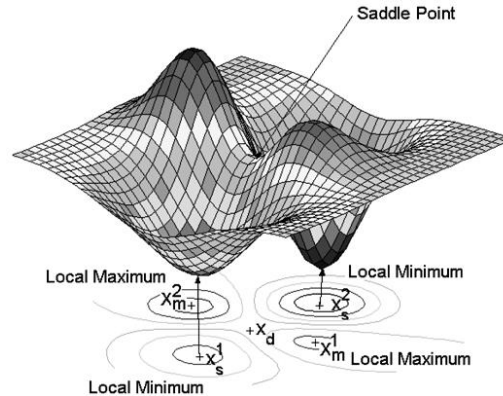
**Figura 15 - Grupos funcionais pesquisados nos fármacos caracterizados como Aceptores de Michael.**



FONTA: AUTORA, 2021.

Os fármacos selecionados foram modelados nos programas ArgusLab (V.4.0.1) e ChemDraw Professional (V.16.0.1.4), assim como tiveram as suas energias minimizadas com propósito de melhorar as coordenadas internas das estruturas, de forma que foi possível obter conformações eficientes e energeticamente baixas. É importante enfatizar que o processo de otimização da conformação de uma molécula se traduz na procura de um ponto mínimo local na superfície de energia potencial, uma vez que há várias combinações de ângulos torcionais, comprimentos e ângulos de ligações. A complexidade da superfície de energia potencial é proporcional aos números de graus de liberdade de rotações, havendo pontos de inflexão, pontos de máximos ou mínimos locais como pode ser visto na figura 16 (DE OLIVEIRA, 2018).

**Figura 16 - Superfície de energia potencial genérica. Um ponto de inflexão ( $+x_d$ ) encontra-se localizado entre dois mínimos locais ( $+x^1_s$  e  $+x^2_s$ ). Os pontos  $+x^1_m$  e  $+x^2_m$  são dois mínimos locais localizados na direção ortogonal.**



FONTE: REDDY e CHIANG, 2006.

### 5.3 - Modelagem por homologia da enzima TMPRSS2

A biblioteca virtual da NCBI forneceu 3.078 resultados para sequências de aminoácidos do alvo biológico de interesse. Foi escolhida a sequência primária *serina protease transmembranar isoforma 2 [Homo sapiens]*, contendo 492 aminoácidos ao longo do formato de arquivo FASTA. Após a realização da busca sequencial da TMPRSS2, a construção do modelo estrutural da enzima seguiu os parâmetros do servidor automatizado SWISS-MODEL, onde inicialmente foi feito um alinhamento entre a sequência-alvo e os moldes disponíveis em seu repositório. A pesquisa dos moldes foi efetuada com o auxílio da biblioteca do BLAST e do HHblits, onde são confrontadas com as sequências de aminoácidos primários contidos na SMTL (SWISS-MODEL *template library* - SMTL versão 2020-07-22, lançamento do PDB em 2020-07-17) para estruturas com relações evolutivas que correspondem à sequência alvo. No servidor foram encontrados um total de 806 moldes, entretanto foram filtrados os 50 melhores *templates*, ou moldes, (tabela 1) para a escolha do usuário.

**Tabela 1 – Cinquenta melhores estruturas-moldes filtrados pelo SWISS-MODEL.**

Molde	Identidade sequencial	Oligo-estado	Encontrado por	Método	Resolução	Similaridade de sequencial	Cobertura	Descrição
5ce1.1.A	33,82	monômero	HHblits	Raio-X	2,50Å	0,38	0,70	Serina protease hepsina

<b>1z8g.1. A</b>	33,82	monômero	HHblits	Raio-X	1,55Å	0,38	0,70	Serina protease hepsina
<b>5ce1.1. A</b>	35,21	monômero	BLAST	Raio-X	2,50Å	0,39	0,69	Serina protease hepsina
<b>1z8g.1. A</b>	35,21	monômero	BLAST	Raio-X	1,55Å	0,39	0,69	Serina protease hepsina
<b>3t2n.1. A</b>	33,82	monômero	HHblits	Raio-X	2,55Å	0,38	0,70	Serina protease hepsina
<b>2xrc.2. A</b>	28,91	monômero	HHblits	Raio-X	2,69Å	0,34	0,77	Fator De Complemento Humano I
<b>2xrc.4. A</b>	28,91	monômero	HHblits	Raio-X	2,69Å	0,34	0,77	Fator De Complemento Humano I
<b>3t2n.1. A</b>	35,21	monômero	BLAST	Raio-X	2,55Å	0,39	0,69	Serina protease hepsina
<b>2xrc.1. A</b>	28,91	monômero	HHblits	Raio-X	2,69Å	0,34	0,77	Fator De Complemento Humano I
<b>2xrc.3. A</b>	28,91	monômero	HHblits	Raio-X	2,69Å	0,34	0,77	Fator De Complemento Humano I
<b>5lyo.3.A</b>	40,33	monômero	HHblits	Raio-X	2,50Å	0,42	0,49	Proteína supressora de tumorigenicidade 14
<b>5lyo.1.A</b>	40,33	monômero	HHblits	Raio-X	2,50Å	0,42	0,49	Proteína supressora de tumorigenicidade 14
<b>6o1g.1. A</b>	42,39	monômero	HHblits	Raio-X	2,20Å	0,43	0,49	Calicreína Plasmática
<b>5lyo.2.A</b>	40,33	monômero	HHblits	Raio-X	2,50Å	0,42	0,49	Proteína supressora de tumorigenicidade 14
<b>5i25.1.A</b>	42,15	monômero	HHblits	Raio-X	2,85Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>1gpz.1. A</b>	31,45	monômero	BLAST	Raio-X	2,90Å	0,37	0,65	Complemento Do Componente C1r

<b>1gpz.2.A</b>	31,45	monômero	BLAST	Raio-X	2,90Å	0,37	0,65	Completo Do Componente C1r
<b>6i44.1.A</b>	42,19	monômero	HHblits	Raio-X	1,36Å	0,42	0,48	Calicreína Plasmática
<b>6t7p.1.A</b>	43,16	monômero	HHblits	Raio-X	1,42Å	0,43	0,48	Calicreína Plasmática
<b>6i58.1.A</b>	42,15	monômero	HHblits	Raio-X	2,60Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>1bui.1.B</b>	39,83	homodímero	HHblits	Raio-X	2,65Å	0,40	0,49	Gene Plasmídeo
<b>5eok.1.A</b>	42,15	monômero	HHblits	Raio-X	2,80Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>5eod.1.A</b>	42,15	monômero	HHblits	Raio-X	3,10Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>1bui.1.A</b>	39,83	homodímero	HHblits	Raio-X	2,65Å	0,40	0,49	Gene Plasmídeo
<b>6d3x.1.A</b>	39,83	monômero	HHblits	Raio-X	1,80Å	0,40	0,49	Gene Plasmídeo
<b>6twb.1.A</b>	42,15	homodímero	HHblits	Raio-X	2,91Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>6q1u.1.A</b>	39,83	monômero	HHblits	Raio-X	2,35Å	0,40	0,49	Gene Plasmídeo
<b>5ugd.1.A</b>	39,83	monômero	HHblits	Raio-X	1,38Å	0,40	0,49	Gene Plasmídeo
<b>6o1g.1.A</b>	44,05	monômero	BLAST	Raio-X	2,20Å	0,44	0,51	Calicreína Plasmática
<b>1yc0.1.A</b>	35,63	monômero	HHblits	Raio-X	2,60Å	0,39	0,50	Ativador do fator de crescimento dos hepatócitos
<b>1ybw.1.A</b>	35,63	monômero	HHblits	Raio-X	2,70Å	0,39	0,50	Ativador do fator de crescimento dos hepatócitos precursor
<b>6i44.1.A</b>	43,25	monômero	BLAST	Raio-X	1,36Å	0,43	0,51	Calicreína Plasmática
<b>5lyo.1.A</b>	43,22	monômero	BLAST	Raio-X	2,50Å	0,44	0,48	Proteína supressora de

								tumorigenicidade 14
<b>5lyo.3.A</b>	43,22	monômero	BLAST	Raio-X	2,50Å	0,44	0,48	Proteína supressora de tumorigenicidade 14
<b>3uir.1.A</b>	39,83	monômero	HHblits	Raio-X	2,78Å	0,40	0,49	Plasmina
<b>6t7p.1.A</b>	44,40	monômero	BLAST	Raio-X	1,42Å	0,44	0,47	Calicreína Plasmática
<b>6kd5.1.B</b>	46,96	monômero	BLAST	Raio-X	2,60Å	0,44	0,47	Serina protease transmembrana 13 (Peptidas e domínio S1)
<b>5lyo.2.A</b>	43,22	monômero	BLAST	Raio-X	2,50Å	0,44	0,48	Proteína supressora de tumorigenicidade 14
<b>5tjx.1.A</b>	41,74	monômero	HHblits	Raio-X	1,41Å	0,42	0,49	Calicreína Plasmática
<b>5f8t.1.A</b>	43,97	monômero	BLAST	Raio-X	1,75Å	0,44	0,47	Calicreína Plasmática
<b>2anw.1.A</b>	43,97	monômero	BLAST	Raio-X	1,85Å	0,44	0,47	Calicreína Plasmática
<b>2any.1.A</b>	43,97	monômero	BLAST	Raio-X	1,40Å	0,44	0,47	Calicreína Plasmática
<b>1bda.1.A</b>	39,34	monômero	BLAST	Raio-X	3,35Å	0,39	0,50	Ativador De Plasminogênio De Cadeia Única Tipo Tecido
<b>2f83.1.A</b>	42,15	monômero	HHblits	Raio-X	2,87Å	0,42	0,49	Fator de coagulação XI
<b>4ogy.2.A</b>	43,97	monômero	BLAST	Raio-X	2,10Å	0,44	0,47	Calicreína Plasmática
<b>1md8.1.A</b>	32,60	monômero	BLAST	Raio-X	2,80Å	0,37	0,55	C1r Protease De Serina Complementar

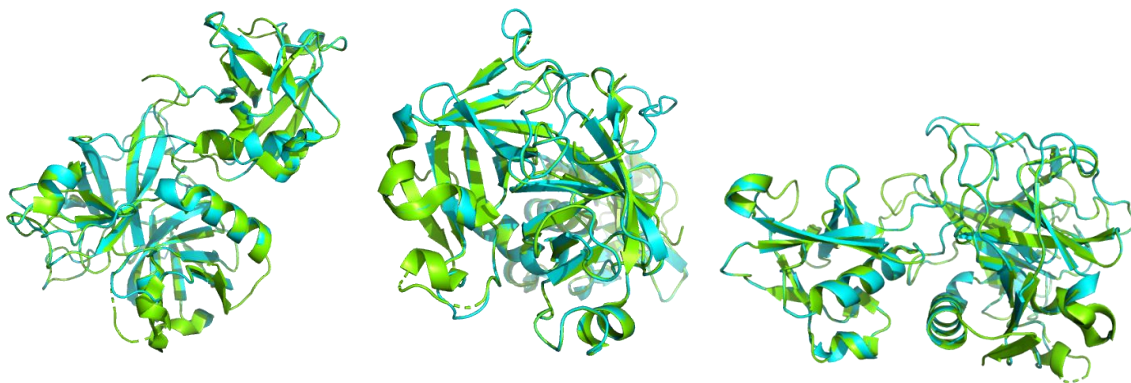


<b>5tjx.1.A</b>	44,02	monômero	BLAST	Raio-X	1,41Å	0,44	0,48	Caliceína Plasmática
<b>1md7.1.A</b>	32,23	monômero	BLAST	Raio-X	3,20Å	0,37	0,55	C1r Protease De Serina Complementar
<b>4gux.1.A</b>	38,52	monômero	BLAST	Raio-X	1,80Å	0,40	0,50	Tripsina catiônica
<b>1co7.1.A</b>	39,34	monômero	BLAST	Raio-X	1,90Å	0,40	0,50	Tripsina II

FONTE: SWISS-MODEL, 2020 (ADAPTADO).

Então, optou-se pelo molde da proteína *serina protease hepsina (5ce1.1A)* com cobertura de 0,70 (ou 70%), identidade de 33,82% em relação a sequência-alvo da enzima TMPRSS2 e RMSD igual a 0,111 (Figura 17). Geralmente uma proteína-molde é considerada favorável quando esta compartilha um valor acima de 30% de identidade acerca da sequência-alvo de interesse, sendo desta forma um modelo confiável para posteriores trabalhos de modelagem molecular. Este percentual depende também do número de resíduos de aminoácidos que a proteína a ser modelada irá conter, sendo considerado entre baixa e péssima qualidade um menor comprimento sequencial de resíduos compreendidos numa faixa de 90-200 aminoácidos (ORRY e ABAGYAN, 2012).

**Figura 17 – Alinhamento comparativo entre o molde 5ce1.1A (verde) e o modelo homólogo da TMPRSS2 (azul ciano) em três diferentes poses.**



FONTE: AUTORA, 2021.

Antes da modelagem do modelo, procedeu-se um alinhamento *pairwise* sequencial entre os resíduos de aminoácidos da proteína-molde e do alvo biológico de interesse utilizando o servidor BLAST como ferramenta. Com isto, verificou-se que há 24 gaps, 133 aminoácidos idênticos e 201 aminoácidos semelhantes entre si no total comparativo sequencial. Além disso, o domínio catalítico encontrou-se conservado com os resíduos idênticos da tríade catalítica de interesse (His296, Asp345 e Ser441), como pode ser visto nas figuras 18 e 19.

**Figura 18 - Alinhamento da sequência de moldes da TMPRSS2 e Serina Protease Hepsina (5CE1.A). Em contornos pretos os resíduos de aminoácidos conservados de His296, Asp345 e Ser441. (Obs.: NP\_005647.3 corresponde ao alvo TMPRSS2).**

```

NP_005647.3      MALNSGSPPAIGPYENHGYQENPYPAQPTVVPTVYEVHPAQYYPSPVPQYAPRVLTQA 60
5CE1_1|Chain    ----- 0

NP_005647.3      SNPVVCTQPKSPSGTVCTSKTKKALCITLTLGTFVLVGAALAAAGLLKFMGSKCSNSGIEC 120
5CE1_1|Chain    ----- 0

NP_005647.3      DSSGTCINPSNWCQGVSHCPGGEDENRCVRLYGPNFILQVYSSQRKSWHPVCQDDWENY 180
5CE1_1|Chain    -----SDQEPLYPVQVSSADARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARV 40
                  ..:: *:: . : * *:: . : * *:: *

NP_005647.3      GRAACRDMGYKNFYSSQIVDDSG--STSFMKLNTSAGNVDI--YKKLYHSDACSSK 234
5CE1_1|Chain    AGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGFFCVDE--GRLPHTQRLLLEIVSVCDCPRG 98
                  . : * : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

NP_005647.3      AVVSLRCIACGVNLSRRQSRIVGGESALPGAWPQVSLHVQNVHVCSSIIITPEWIVTA 294
5CE1_1|Chain    RFLAAICQDCGRR--KLPVDRIVGGRTSLGRWPQVSLRYDGAHLCCGGSLLSGDWVLT 156
                  ..: * * * . . . * * * * . : * * * * * : . : * * * * * : : * : *

NP_005647.3      AHVEKPLNPNWHWTFAGILRQSFMYGAGYQVEKVIS-----HPNYDSKTKNNIDIAL 348
5CE1_1|Chain    AHCFPERNRVLSRWRFAGAVAQASPH-GLQLGVQAVVYHGGYLPFRDPNSEENSIDIAL 215
                  * * . : . : * * * * : * : * * : * : * : * : * : * : * * *

NP_005647.3      MKLQKPLTFNDLVKPVCLPNPGMMLQPEQLCWSISGNWATEEKGKTSEVLNAAKVLLIETQ 408
5CE1_1|Chain    VHLSSPLLTEYIQPVCLPAAAGQALVDGKICTVTGWGNTQYVGGQAGVLQEARVPIISND 275
                  : * . * * : : : * * * * * * * * : * : * * * * : * : * * : * : * : *

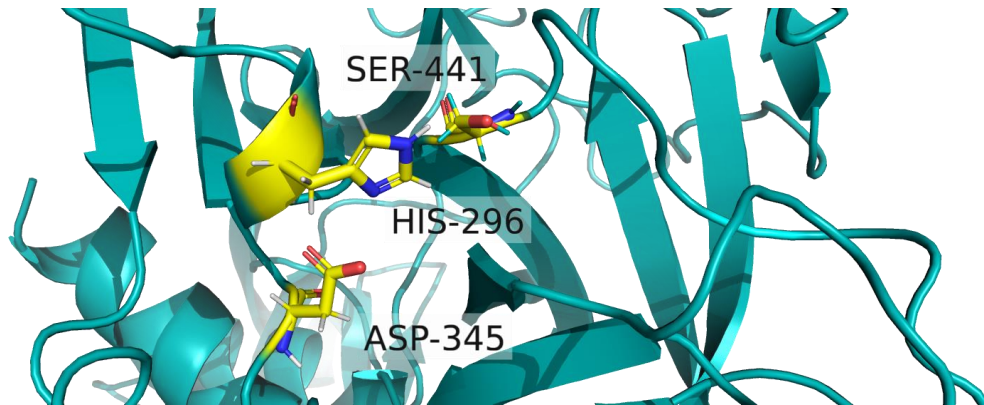
NP_005647.3      RCNSRYVDNLITPAMICAGFLQGNVDSQGDSSGGPLVTS---KNNIWNLIIGDTSWGS 464
5CE1_1|Chain    VCNADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGGPFVCEDSISRTPRWRLCGIVSWG 335
                  * * . : * * * * * * * * * * : * : * * * * * * * * : . : * * * * * * *

NP_005647.3      CAKAYRPGVYGNVMVFTDWIYRQMRADG----- 492
5CE1_1|Chain    CALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEASGMVTQL 372
                  * * * : * * * * * * * * * * : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

FONTE: CLUSTAL OMEGA, 2020 (ADAPTADO).

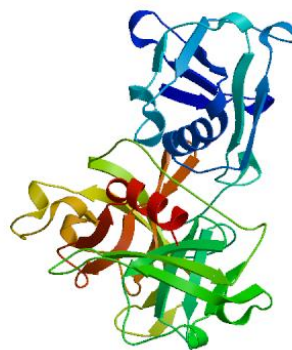
**Figura 19 - Resíduos-chave (amarelo) do sítio ativo de ligação.**



FONTE: AUTORA, 2021.

Com base no procedimento de alinhamento, o modelo homólogo foi criado conservando-se as coordenadas entre o alvo e o molde no modo oligo-estado monômero pelo ProMod3 versão 3.0.0 - ainda no servidor SWISS-MODEL. Utilizando uma biblioteca de fragmentos, as inserções e exclusões foram remodeladas, as cadeias laterais foram reconstruídas e aplicando um campo de força a geometria do modelo foi regularizada, o que corrobora com *Guex et al. (2009)* e *Bertoni et al. (2017)* Vale destacar que a enzima homóloga modelada não possui ligante complexado (Figura 20), pois conforme o relatório do servidor, os resíduos de aminoácidos originais do sítio ativo do molde não foram conservados para o modelo da TMPRSS2.

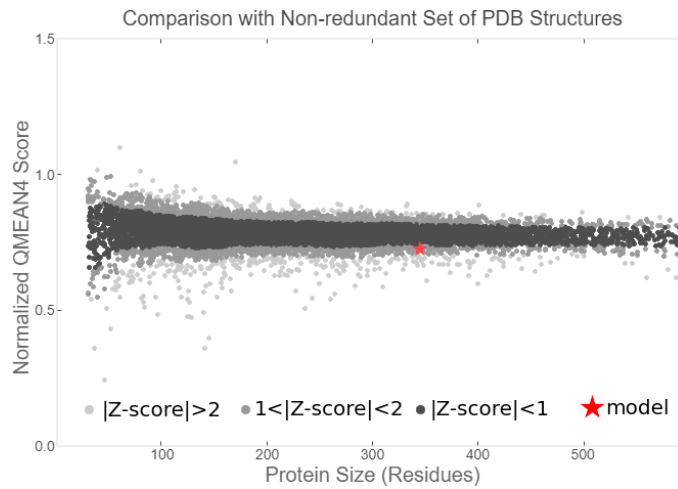
**Figura 20 - Estrutura tridimensional modelada da TMPRSS2.**



FONTE: SWISS-MODEL, 2020.

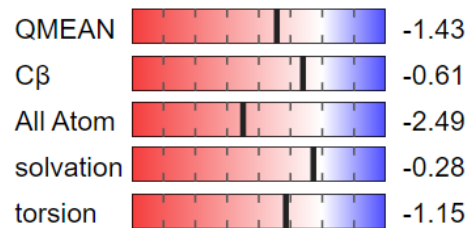
No que diz respeito a avaliação estrutural da enzima homóloga, o modelo apresentou pontuação de QMEAN (*Qualitative Model Energy Analysis*) igual a -1,43, indicando uma boa estimativa da qualidade absoluta global e local com base em um único modelo. A pontuação de QMEAN é um parâmetro de estimação do grau de semelhança, mostrando quanto o modelo é preciso ao ser comparado com estruturas experimentais de tamanho similar. Pontuações mais próximas de zero apontam modelos satisfatórios e pontuações menores que -4,0 são indicativos de modelos com baixa qualidade (BENKERT et al., 2011). Outra maneira de avaliar o modelo que está intrinsicamente relacionada com a métrica QMEAN é a pontuação de Z-score. Esta fornece um resultado quantitativo e mais robusto sobre a estimativa do grau de natalidade de aspectos estruturais no contexto global, associando o modelo específico com o que se pode esperar de proteínas resolvidas experimentalmente por difração de raio X e por ressonância magnética nuclear (FERREIRA, 2016; WATERHOUSE, 2018). Para o modelo homólogo da TMPRSS2 foi obtido o gráfico representado na figura 21 para a função de Z-score, onde o eixo y encontra-se o score de QMEAN4 normalizado e o eixo x determina o tamanho da proteína (quantidade de resíduos). Nota-se que para o modelo construído, marcado com uma estrela vermelha, a pontuação de Z-score ficou entre menor que 2 e maior que 1, na faixa dos pontos cinza escuros. Isto significa que o modelo obtido da estrutura experimental *5ce1.1A* está um pouco fora do desvio padrão da média, que corresponde aos pontos pretos no gráfico (BENKERT et al., 2011). De forma sucinta, o modelo homólogo é mediano; contudo, ao analisar as estimativas globais dos quatro termos estatísticos individuais de QMEAN tem-se que o descritor de interação  $C\beta$ , que informa interações em pares entre os carbonos beta dos 20 aminoácidos padrões, é igual a -0,61. Enquanto, a interação entre todos os átomos do modelo (*interaction all-atom*) é igual a -2,49, a solvatação dos resíduos de aminoácidos (*solvation*) e a torção geométrica local do ângulo de três resíduos de aminoácidos consecutivos (*torsion*), apresentam valores iguais a -0,28 e -1,15, respectivamente. Todos esses valores apontam que apesar do modelo homólogo pontuar abaixo das estruturas experimentais em média, o mesmo fornece pontuações aceitáveis e próximo de zero. Isto pode ser visualizado no gráfico de barras da figura 22, onde a região branca indica que a propriedade é semelhante ao que se esperaria de estruturas experimentais de tamanho similar (BENKERT et al., 2011; BENKERT et al., 2009).

**Figura 21 – Gráfico da pontuação de Z-Score.**



FORNTE: SWISS-MODEL, 2020.

**Figura 22 – Estimativa de qualidade global do QMEAN para o modelo.**



FORNTE: SWISS-MODEL, 2020.

Em adição a avaliao do modelo da TmprSS2, o relatório do servidor SWISS-MODEL exibe uma estimativa de qualidade correlacionada com a estimativa de QMEAN cuja denominao  Global Model Quality Estimation (GMQE). A métrica GMQE combina propriedades do alinhamento entre a sequência alvo e o molde, sendo esta pontuao expressa no intervalo entre 0 e 1 (WATERHOUSE et al., 2018; BIASINI et al., 2014). Para o modelo homólogo escolhido a pontuao de GMQE foi igual 0,53, em que comparado com outros moldes apresentados no SWISS-MODEL este valor foi o melhor, tendo em vista que quanto mais próximo de 1 reflete maior confiabilidade (BIASINI et al., 2014).

A estimativa da qualidade local do modelo foi relatada pelo SWISS-MODEL através do gráfico da figura 23, onde o eixo y representa a similaridade local prevista para o alvo biológico e o eixo x o número de resíduos de aminoácidos. O gráfico está baseado na pontuao IDDT

(*Local Distance Difference Test*) que consiste em avaliar as diferenças de distância local de todos os átomos do modelo homólogo no intervalo de 0 a 1, incluindo a razoabilidade estereoquímica (MARIANI et al., 2013; STUDER et al., 2020). Usualmente, é esperado que os resíduos com pontuação acima de 0,6 sejam de alta qualidade. Assim, observa-se na figura 23 que existem algumas regiões no modelo da enzima homóloga com scores abaixo de 0,6, indicando que a semelhança com a estrutura nativa é baixa para determinados resíduos. Embora, ao analisar as regiões onde se encontram a tríade do sítio catalítico da Tmprss2, nota-se que os resíduos Ser441, His296 e Asp345 estão estimados em locais que representam qualidade confiável.

**Figura 23 – Gráfico da estimativa da qualidade local do modelo construído por homologia.**

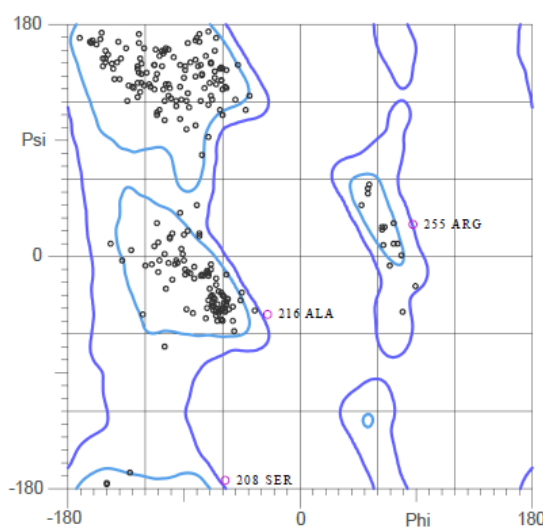


FONTE: SWISS-MODEL, 2020.

No servidor MolProbity, foi observada a qualidade dos ângulos diédricos da estrutura tridimensional do modelo homólogo, no qual foi obtido o diagrama de Ramachandran da figura 24. Este tipo de representação gráfica é uma ferramenta útil para descrever visualmente as combinações dos ângulos diedros  $\varphi$  e  $\psi$  permitidos ou não permitidos em um esqueleto peptídico, em torno das respectivas ligações N-C $\alpha$  e C $\alpha$ -C (NELSON e COX, 2014). Ao checar o diagrama relatado pelo servidor online, observou-se que 92,2% (317/344) de todos os resíduos se encontram em (98%) regiões favoráveis dentro dos contornos azuis claro, 99,1% de todos os resíduos estão em (>99,8%) regiões permitidas dentro das linhas azuis escuro, e 3 resíduos (Ser208, Ala216 e Arg255) estão em regiões não favoráveis na porção branca, como é mostrado

na figura 24. Estes resultados indicam a geometria coerente e boa disposição tridimensional do modelo, visto que é considerado percentual mínimo de 90% para que um modelo possua resíduos dentro das regiões energeticamente favoráveis (LASKOWSKI et al., 1993; LOVELL et al., 2003), incluído os resíduos essenciais do sítio catalítico da TMPRSS2.

**Figura 24 – Diagrama de Ramachandran.**



FONTE: MOLPROBITY, 2020.

#### 5.4 – Validação do processo de ancoragem molecular

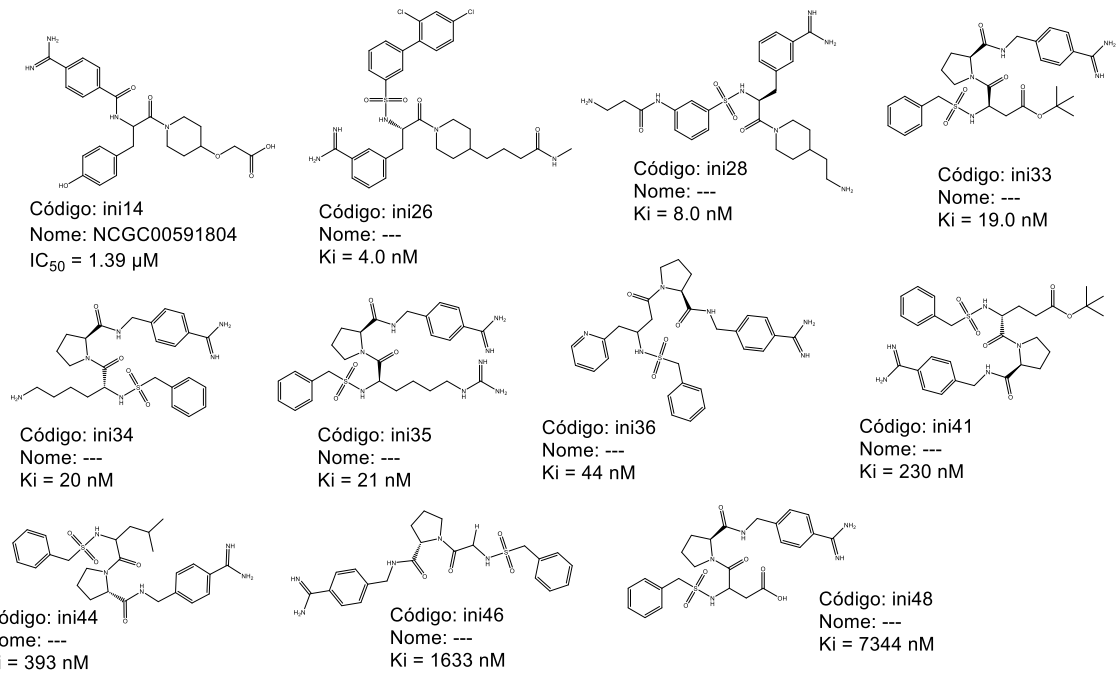
A validação do processo de ancoragem molecular passou por um teste falso-positivo com o propósito de evitar uma metodologia enviesada, levando em consideração o fato de ter sido realizada uma modelagem comparativa da enzima TMPRSS2 e da disposição posterior da estrutura experimental deste mesmo alvo biológico no banco de dados Protein Data Bank. Como a enzima modelada por homologia não possui ligante complexado, isto seria uma limitação para efetivação do processo de re-docking usual em termos comparativos com que seria realizado na estrutura cristalina. Com o intuito de evitar esta adversidade, para a validação do protocolo de docking foram selecionadas 62 moléculas ativas e não ativas frente à enzima TMPRSS2, provenientes de experimentos abordados por *Shrimp et al. (2020)*, *Hu et al. (2021)*, *Cannalire et al. (2020)*, e *Meyer et al. (2013)*. Essas moléculas foram desenhadas, codificadas e tiveram suas energias minimizadas conforme o que foi feito para os 230 fármacos ligantes selecionados para a triagem virtual.

A partir do protocolo de ancoragem molecular executada em triplicata, tanto com o pdb 7MEQ quanto com o pdb homólogo, pôde-se verificar por meio dos complexos gerados que:

- 1) Os valores de fitscore dos dockings do pdb homólogo foram mais homogêneos comparados aos do 7MEQ. Sendo que os desvios padrões calculados foram menores para uma grande parte de seus complexos, implicando em uma menor variabilidade em torno da média. As análises podem ser consultadas nas tabelas 3 e 4 do apêndice A;
- 2) Apenas a molécula com o código ini 44 interagiu com os resíduos da tríade catalítica quando ancorada no pdb 7MEQ (Observação: ini 44 é uma molécula inativa frente a Tmprss2);
- 3) Por outro lado, as moléculas com códigos ini 14, ini 26, ini 28, ini 33, ini 34, ini 35, ini 36, ini 41, ini 46 e ini 48 interagiram com a mesma tríade quando ancoradas no pdb homólogo. Desta lista, ini 46 e ini 48 são moléculas inativas frente a Tmprss2 (Figura 25). Além disso, checkou-se que o RMSD dos resíduos principais entre os pdbs foi igual 0,263 Å (figura 26), sendo este um valor dentro do limite aceitável para o desvio abaixo de 2 Å (SANTOS FILHO e ALENCASTRO, 2003). Em consequência destes resultados, optou-se por fim utilizar o pdb homólogo para os dockings moleculares dos fármacos aceptores de Michael.

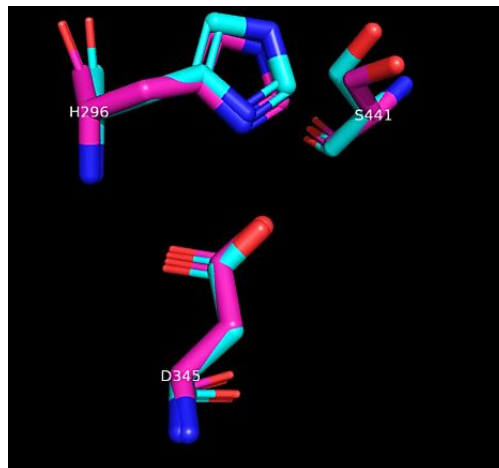


**Figura 25 – Alguns inibidores ativos e inativos de TMPRSS2 utilizados no banco de dados.**



FONTE: AUTORA, 2021.

**Figura 26 – Alinhamento entre os resíduos da tríade catalítica presentes no pdb da TMPRSS2 homóloga (azul ciano) e no pdb 7MEQ (rosa magenta).**



FONTE: AUTORA, 2021.

### 5.5 – Ancoragem molecular e docking covalente

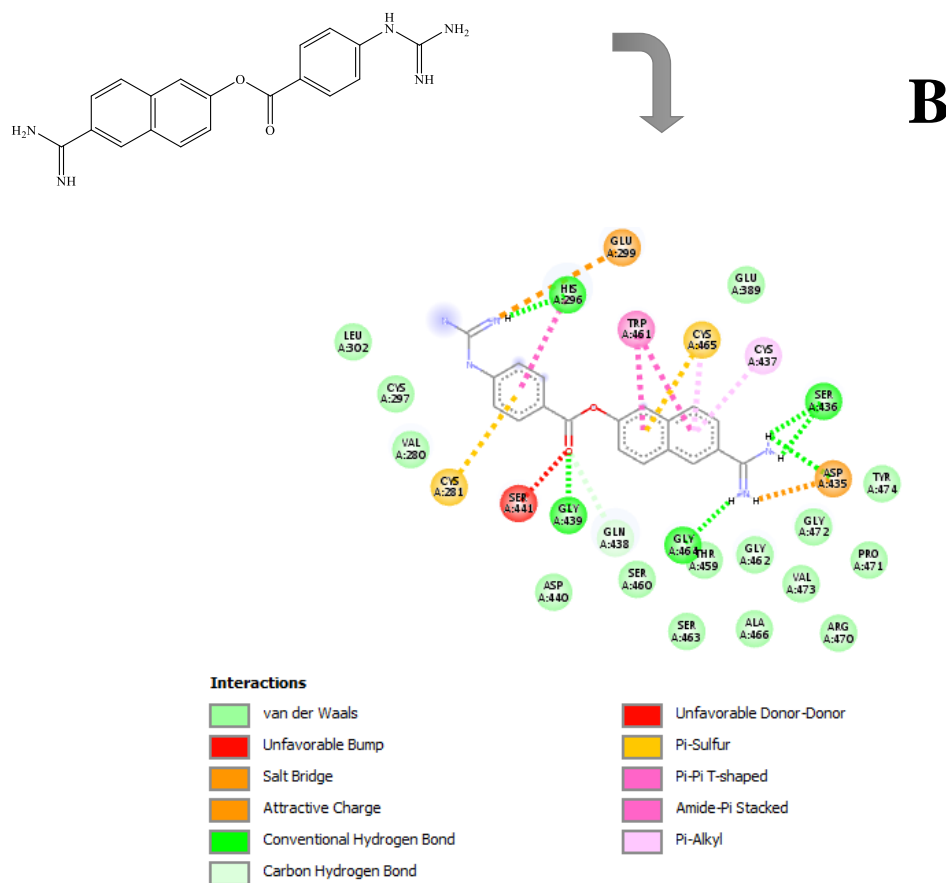
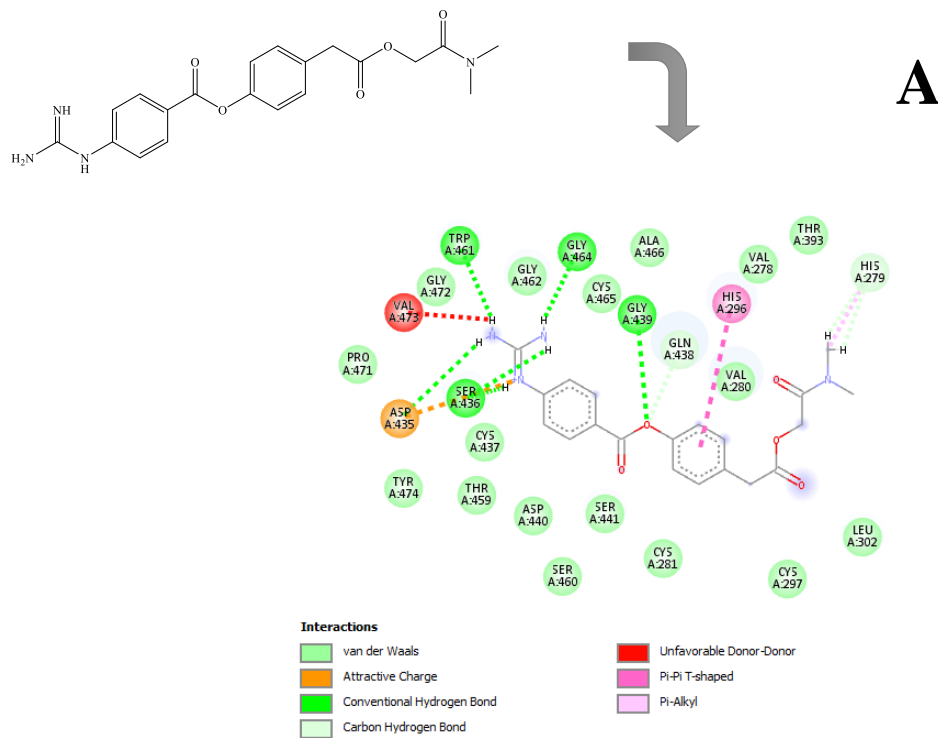
Com base nas características do receptor homólogo e dos fármacos selecionados nos bancos de dados, ancorou-se no software GOLD (V.5.8.0) os 230 ligantes na enzima homóloga,

em que apenas 90 deste total apresentaram valores médios de pontuações mais alta do que o nafamostatato e camostatato, fármacos padrão de referência. Em particular, foi dada ênfase nos três resíduos-chave da tríade catalítica da TMPRSS2 (Ser441, His296 e Asp345), mantendo a His296 em sua forma neutra ( $N_\delta$  protonado) e o átomo de oxigênio (OG) da Ser441 como ponto de apoio para a definição do local de atracamento.

Em relação aos tipos de interações feitas pelos fármacos com o receptor, eles correspondem à interação de van der Waals, ligação de hidrogênio clássica e não clássica, empilhamento- $\pi$ , empilhamento-T, interação  $\pi$ -alquila,  $\pi$ -enxofre, interação iônica, interação repulsiva, interação  $\pi$ -par isolado e interação alquila-alquila. Os inibidores padrões interagiram com diferentes resíduos, onde inclui os mais importantes como Ser441, His296, Gly439 e Asp435, onde dois primeiros deles pertencem a tríade catalítica e o último ao S1 pocket presente na enzima, sendo Asp435 capaz de estabilizar o estado de complexo de Michael e auxiliar a orientação das moléculas numa conformação adequada para a inibição do alvo. Enquanto Gly439 juntamente com Ser441 tem a função de ajudar na ativação do processo de inibição da enzima, essas análises são confirmadas pelos estudos de HEDSTROM e HEMPEL et al.

É importante destacar, que a partir da análise visual 2D feita pelo software Discovery Studio (V.20.1) tanto o camostatato quanto o nafamostatato apresentaram uma interação desfavorável com os resíduos Val473 e Ser441, respectivamente (Figura 27A e 27B). Mais adiante também veremos outra interação desfavorável feita por um fármaco selecionado como promissor na pesquisa. De acordo com *Dhorajiwala et al. (2019)*, ligações desfavoráveis afetam a estabilidade entre o complexo proteína-ligante, indicando a existência de forças repulsivas que ocorrem entre um átomo ou duas moléculas. Entretanto, a interação desfavorável não significa necessariamente que o protocolo virtual seja falho e determinado inibidor seja bom ou ruim. Efeitos mal contabilizados no docking podem ocasionar interações desfavoráveis, tais como solvente, entropia do sistema, parceiros de interação, entre outros fatores (Du et al., 2016).

**Figura 27 – Representação bidimensional dos fármacos camostato (A) e nafamostato (B) realizando interações com alguns resíduos da enzima TMPRSS2.**

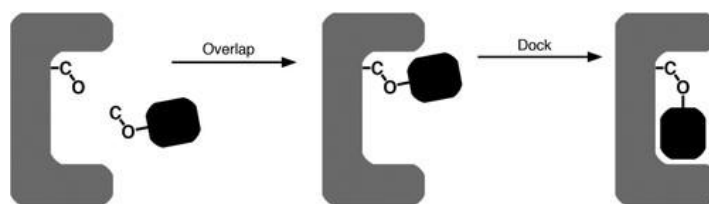


FONTE: AUTORA, 2021.

Em relação aos noventa fármacos mencionados anteriormente, eles variaram suas interações entre os três resíduos da tríade catalítica (Ser441, His296 e Asp345) e do S1 pocket (Asp435), sendo que quatro deles interagiram com todos estes resíduos de aminoácidos citados e apenas um fármaco interagiu somente com os resíduos da tríade, como pode ser visto na tabela 2. Em adição, estes cinco fármacos em especial também tiveram variações de interações polares e apolares com os resíduos Gly439, Gln438, Glu299, Val280, Tyr337 e Leu 302, uma vez que são considerados resíduos relevantes para o reconhecimento, ligação, estabilização e orientação da conformação reativa dos ligantes dentro do sítio ativo catalítico da TMPRSS2 (HEMPEL et al., 2021; HU et al., 2021; IDRIS et al., 2020; KUMAR et al., 2020).

Para os estudos de docking covalente, foi utilizado o método de cadeia lateral flexível (*flexible side chain method*) que provém dos estudos de *BIANCO et al. (2016)* e executado pela arquitetura do programa AutoDock4. Neste método o ligante é unido em uma conformação arbitrária com o receptor, sendo modelado o ligante anexado como um lado totalmente flexível a cadeia da proteína na simulação, de forma semelhante a outros programas de docking como demonstrado na figura 28.

**Figura 28 - Diagrama esquemático da abordagem *flexible side chain method*, com a proteína em cinza e o ligante em preto.**



FONTE: BIANCO ET AL., 2016.

Com esta finalidade, escolheu-se somente aqueles fármacos que apresentaram os seguintes resultados teóricos: 1) Ligantes com valores de fitscore melhores que os fármacos de referência; 2) fármacos que interagiram com a tríade catalítica; 3) E também aqueles que tiveram uma distância menor ou igual a 3,4 Å entre o grupo eletrofílico de suas estruturas e o átomo de oxigênio do resíduo Ser441, este essencial para a formação da possível ligação covalente. Os resultados obtidos expressam que os fármacos selecionados para os cálculos tiveram energia livre de ligação menor ou igual a +41,78 Kcal/mol. Três deles apresentaram

valores de energia muito menor do que o nafamostato e o camostato, sendo que estes dois apresentaram valores de -6,58 Kcal/mol e -5,90Kcal/mol, respectivamente. Estes resultados indicam uma excelente simulação efetiva para que ocorra uma ligação covalente real por parte dos três fármacos pesquisados. Na tabela 2 é possível visualizar os resultados referentes a energia covalente para os fármacos selecionados nesta etapa. Com isto, os fármacos identificados para os próximos passos do projeto foram cefpiramida, cefotaxima e pelitinibe (Figura 29A, 29B e 29D); dois antibióticos e um antineoplásico aprovados pela FDA, respectivamente. Nas figuras 30A, 30B e 30C podemos visualizar as interações que estes três fármacos promissores podem fazer com outros resíduos de aminoácidos.

A molécula de cefpiramida estabeleceu interações de van der Waals semelhantes aos fármacos de referência através dos resíduos de aminoácidos Gly472, Gly462, Cys297, Cys281, Ser441, Asp440, Cys297, Asp440, Thr459 e Gly472. Também foi observado interações hidrofóbicas, com os anéis aromáticos substituídos benzeno e tetrazol pertencentes ao fármaco, por meio de Cys464, Val280, Val275, Val278 e Leu302, enquanto Ser436, Cys437 e Trp461 fazem contatos por empilhamento  $\pi$ . Os resíduos de aminoácidos Lys342, Gln438, Gly439 e His296 fazem ligação de hidrogênio com cefpiramida, sendo que a cadeia lateral de His296 interagem com o fármaco por interações  $\pi$ -enxofre, elétrons  $\pi$  isolados e ligação não clássica carbono-hidrogênio. Para a molécula de cefotaxima foram vistas interações de van der Waals similares aos fármacos de referência por meio de Ala466, Ser460, Asp440, Thr459, Cys437, Val473, Arg470, Gly472, Pro471 e Tyr474. Foram observadas interações hidrofóbicas e por empilhamento  $\pi$  com as cadeias laterais de Cys465 e Trp461, respectivamente. Observou-se interações de hidrogênio com as cadeias laterais de Ser436, Ser441 e Gly462, interação não clássica carbono-hidrogênio com os resíduos Gly472, Ser436, His296, Lys342 e Asp345. Enquanto a molécula de pelitinibe fez interações de van der Waals com Cys297, Val280, Asp440, Thr459, Gly462, Val473 e Gly472, contatos estes realizados por nafamostato. Foram constatadas interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de Cys281, Trp461 e His296, com estes dois últimos resíduos fazendo os mesmos contatos visto para o nafamostato (figura 27B). Além disso, His296 interagem com pelitinibe através da interação por empilhamento  $\pi$ . A ligação de hidrogênio foi vista para os resíduos Ser441, Gly439, Lys342, Ser460, Gln 438 e Gly439, e ligação não clássica carbono-hidrogênio foi observada para os resíduos Asp345, Tyr337, Gly464, Ser436 e Gln438.

De modo geral, as interações intermoleculares são muito importantes para o processo de estabilização e reconhecimento molecular do fármaco no sítio do receptor, pois as somas

energéticas são favorecidas criando uma forte coesão (PATRICK, 2013; BARREIRO e FRAGA, 2015). Durante a inspeção visual, foram notados cinco tipos de interações que tanto os fármacos de referência fazem quanto os três fármacos promissores deste trabalho. Elas são interações de van der Waals, hidrofóbicas, empilhamento  $\pi$ , ligação de hidrogênio e ligação não clássica carbono-hidrogênio. No entanto, é importante salientar que as estruturas e forças intermoleculares demonstradas nos diagramas das figuras 27A, 27B, 30A, 30B e 30C devem ser compreendidas como “momentâneas”, havendo diversas possibilidades estruturais em equilíbrio que se sucedem com aspectos termodinâmicos e cinéticos na biofase (FOKOUÉ et al., 2020).

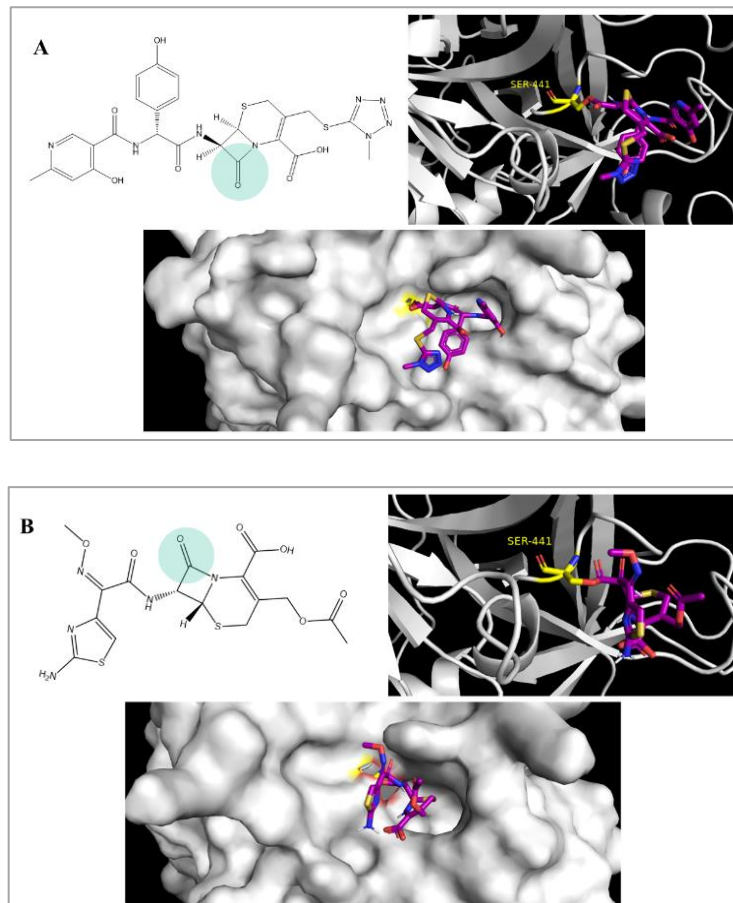
**Tabela 2 – Dados dos estudos realizados com os melhores fármacos.**

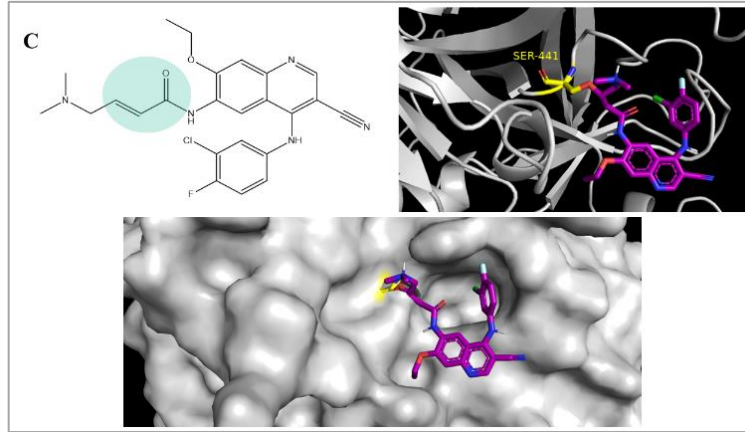
Fármacos de Referência								
TMPRSS2					Resíduos Essenciais			Plus
Nome original	Código	Score Médio	Ser441	Energia Covalente	Ser441	His296	Asp345	Asp 435
Nafamostato	Drug229	59,4935	2,639Å	-6,58 Kcal/mol	Colisão Desfavorável / Doador-Doador Desfavorável	Ligação de H/ Pi-pi Em forma de T/ Amida-Pi Empilhado	x	Ligação de H/Ponte Salina/Carga Atrativa
Camostato	Drug230	62,3511	2,592Å	-5,90 Kcal/mol	van der Waals	pi-pi em forma de T	x	Carga atrativa/ligação de H
Fármacos Selecionados								
TMPRSS2					Resíduos Essenciais			Plus
Nome original	Código	Score Médio	Ser441	Energia Covalente	Ser441	His296	Asp345	Asp 435
Cefpiramida	drug129	81,0705	3,360Å	-11,29 Kcal/mol	van der Waals/ ligação de C-H	H bond / Pi-Lone Pair/ Pi-Sulfur/ C-H bond	van der Waals	van der Waals
Cefotaxima	drug134	72,6298	3,283Å	-7,19 Kcal/mol	ligação de H	Ligação de C-H	Ligação de C-H	van der Waals
Cefdinir	drug135	68,6797	3,194Å	-5,23 Kcal/mol	ligação de H	Ligação de C-H	van der Waals	van der Waals
Cefixima	drug139	72,4129	2,805Å	+41,78 Kcal/mol	ligação de H	Ligação de C-H / Pi-Pi em forma de	ligação de H	van der Waals

						T / par Pi-lone		
<b>Pelitinibe</b>	drug177	60,7036	2,866Å	-7,71 Kcal/mol	Ligação de C- H/ligação de H	Pi-Pi Empilha do/Alqui l/Pi- Alquil	Ligação de C-H	x

FONTE: AUTORA, 2021.

**Figura 29 – Cefpiramida (A), Cefotaxima (B) e Pelitinibe (C). Em destaque verde os grupos eletrofílicos participantes da ligação covalente, em detalhe branco a enzima TMPRSS2 no formato cartoon e superfície, em roxo o ligante fazendo a ligação covalente com o resíduo de Ser441 em amarelo.**

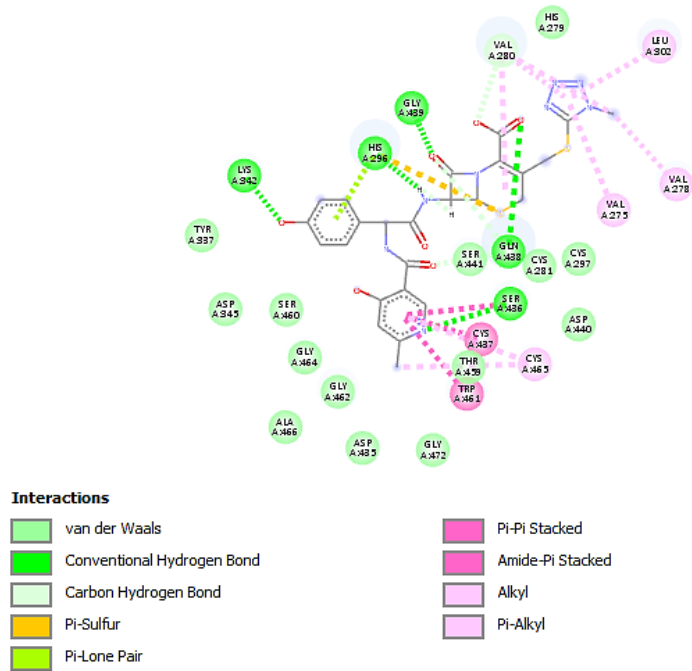




FONTE: AUTORA, 2022.

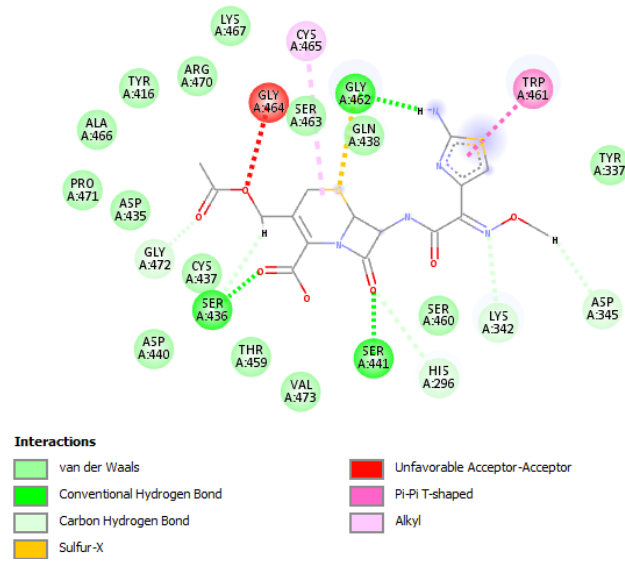
**Figura 30 – Interações dos fármacos promissores com os diferentes tipos de resíduos (A – Cefpiramida; B – Cefotaxima e C – Pelitinibe).**

**A**

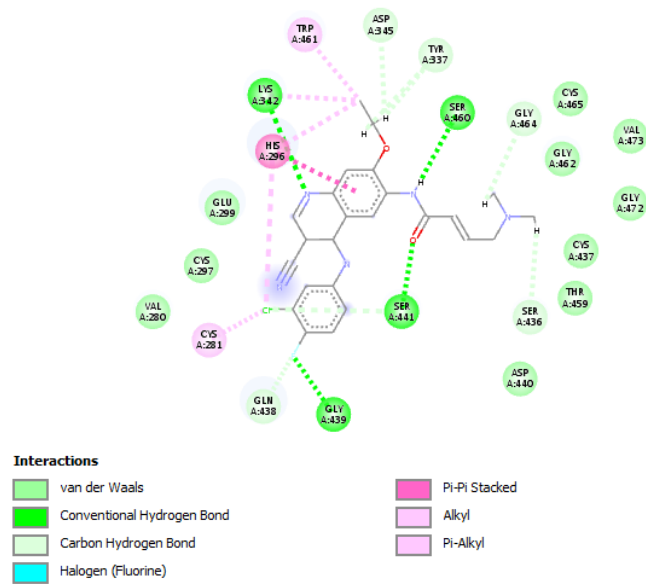




B



C



FONTE: AUTORA, 2021.

## 6 – CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível construir a estrutura tridimensional da enzima protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) através da modelagem por homologia, tendo como base o molde da estrutura cristalográfica da *serina protease hepsina (5ce1.1A)*. O modelo homólogo foi validado por diferentes métricas e parâmetros avaliadores como o RMSD, o QMEAN, o GMQE, o Z-Score e o gráfico de Ramachandran, resultando na confirmação de um modelo de qualidade para a realização das etapas de triagem virtual.

Com a seleção de 230 fármacos ligantes nos bancos de dados da NIH Chemical Genomics Center (NCGC), Pharmaceutical Collection (NPC), DrugBank e do ChEMBL, os mesmos tiveram as suas estruturas minimizadas energeticamente por métodos semiempíricos e, posteriormente, foram ancorados no sítio catalítico da enzima homóloga pelo programa GOLD (V.5.8.0). Os resultados obtidos mostraram que cinco deles interagiram com os resíduos de aminoácidos da tríade catalítica (Ser441, His296 e Asp345), apresentaram valores médios de pontuações de score mais alta do que os fármacos padrões de referência nafamostato e camostato e também possuíam os seus carbonos eletrofílicos a uma distância menor ou igual a 3.4 Å até o grupo -OH do resíduo Ser441.

Utilizado o método de cálculo da cadeia lateral flexível (*flexible side chain method*) através do programa AutoDock4, obtivemos como resultados que os cinco fármacos filtrados nas etapas de ancoragem molecular e inspeção visual tiveram energia livre de ligação menor ou igual a +41,78 Kcal/mol. No entanto, três fármacos mostraram menores valores de energia comparados aos valores de energia do nafamostato e o camostato, que foram respectivamente iguais a -6,58 Kcal/mol e -5,90 Kcal/mol. Dessa forma, os fármacos identificados foram os antibióticos cefpiramida e cefotaxima, e o antineoplásico pelitinibe, todos aprovados pela FDA.

Como perspectiva futura, pretendemos dar prosseguimento as etapas de dinâmica molecular. Por meio da cooperação com outros grupos de pesquisas de outras instituições de ensino superior, realizaremos os testes *in vitro* com os fármacos identificados na triagem virtual, contemplando o ensaio de inibição enzimática frente a TMPRSS2.

## REFERÊNCIAS

AFAR, D. E.; VIVANCO, I.; HUBERT, R. S.; KUO, J.; CHEN, E.; SAFFRAN, D. C.; RAITANO, A. B.; JAKOBOVITS, A. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer research*, v. 61, n. 4, p. 1686-1692, 2001.

AL-HORANI, Rami A.; DESAI, Umesh R. Recent advances on plasmin inhibitors for the treatment of fibrinolysis-related disorders. *Medicinal research reviews*, v. 34, n. 6, p. 1168-1216, 2014.

ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M; FARIA, T. D. J. Da Química Medicinal à química combinatória e modelagem molecular: um curso prático. 2ª ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

ANDRICOPULO, Adriano D.; SALUM, Lívia B.; ABRAHAM, Donald J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 9, n. 9, p. 771-790, 2009.

ARROWSMITH, John; HARRISON, Richard. Drug repositioning: the business case and current strategies to repurpose shelved candidates and marketed drugs. *Drug Repositioning: Bringing New Life to Shelved Assets and Existing Drugs*, v. 9, 2012.

ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews Drug discovery*, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.

BANEGAS-LUNA, Antonio-Jesús; CERÓN-CARRASCO, José P.; PÉREZ-SÁNCHEZ, Horacio. A review of ligand-based virtual screening web tools and screening algorithms in large molecular databases in the age of big data. *Future medicinal chemistry*, v. 10, n. 22, p. 2641-2658, 2018.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. *Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2015.

BAUER, Renato A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug discovery today*, v. 20, n. 9, p. 1061-1073, 2015.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011.

BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation. *Nucleic Acids Res.*, v.37(Web Server issue), p.W510-4, 2009.

BERTONI, M.; KIEFER, F.; BIASINI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.

BESTLE, Dorothea et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance*, v. 3, n. 9, 2020.

BIANCO, Giulia; FORLI, S.; GOODSSELL, D. S.; OLSON, A. J. Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Science*, v. 25, n. 1, p. 295-301, 2016.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; ARNOLD, K.; STUDER, G.; SCHMIDT, T.; KIEFER, F.; CASSARINO, T. G.; BERTONI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, v. 42, n. W1, p. W252-W258, 2014.

BITENCOURT-FERREIRA, Gabriela; DE AZEVEDO, Walter Filgueira. How Docking Programs Work. In: *Docking Screens for Drug Discovery*. Humana, New York, NY, 2019. p. 35-50.

BRAGA, T. C.; SILVA, T. F.; MACIEL, T. M. S.; DA SILVA, E. C. D.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F.; MODOLO, L. V.; FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, J. C. C.; DE AQUINO, T. M.; DE FÁTIMA, Â. Ionic liquid-assisted synthesis of dihydropyrimidin(thi)one Biginelli adducts and investigation of their mechanism of urease inhibition. *New Journal of Chemistry*, v. 43, n. 38, p. 15187-15200, 2019.

BRANDEN, Carl Ivar; TOOZE, John. *Introduction to protein structure*. Garland Science, 2012.

CANNALIRE, R., STEFANELLI, I., CERCHIA, C., BECCARI, A. R., PELLICCIA, S.; SUMMA, V. Sars-cov-2 entry inhibitors: Small molecules and peptides targeting virus or host cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 16, p. 5707, 2020.

CHANDRASEKARAN, G.; HWANG, E. C.; KANG, T. W.; KWON, D. D.; PARK, K.; LEE, J. J.; LAKSHMANAN, V. K. Computational modeling of complete hoxb13 protein for predicting the functional effect of snps and the associated role in hereditary prostate cancer. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2017.

CHENG, T.; LI, Q.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; BRYANT, S. H. Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *The AAPS journal*, v. 14, n. 1, p. 133-141, 2012.

CHOI, J. Y., KANG, Y. J., JANG, H. M., JUNG, H. Y., CHO, J. H., PARK, S. H., KIM, Y. L., KIM, C. D. Nafamostat mesilate as an anticoagulant during continuous renal replacement therapy in patients with high bleeding risk: a randomized clinical trial. *Medicine*, v. 94, n. 52, 2015.

CHOUDHRY, N., ZHAO, X., XU, D., ZANIN, M., CHEN, W., YANG, Z., CHEN, J. Chinese therapeutic strategy for fighting COVID-19 and potential small-molecule inhibitors against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of medicinal chemistry*, v. 63, n. 22, p. 13205-13227, 2020.

CLINICAL TRIALS.GOV. A Dose Ranging Study Evaluating Efficacy and Safety of NI-03 (Tactic), 2021. Disponível em: < <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02693093> >. Acesso em: 09 de abril de 2022.

COMBA, Peter; HAMBLEY, Trevor W.; MARTIN, Bodo. Molecular modeling of inorganic compounds. 3ªed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2009.

COOPER, Geoffrey M.; HAUSMAN, Robert E. La célula. 5ª ed. Madrid: Marbán libros, 2010.

DE CESCO, S.; KURIAN, J.; DUFRESNE, C.; MITTERMAIER, A. K.; MOITESSIER, N. Covalent inhibitors design and discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 138, p. 96-114, 2017.

DE MOURA, T. R.; ZANETTI, R. D.; SILVA, D. E. S.; DE FARIAS, R. L.; MAURO, A. E.; PEREIRA, J. C. M.; DE SOUZA, A. A.; SIQUEIRA, F. D. S.; JÚDICE, W. A. D. S.; LIMA, M. A.; ROCHA, F. V.; DEFLON, V. M.; DE GODOY NETTO, A. V. Palladium (ii) complexes bearing 1-iminothiolate-3, 5-dimethylpyrazoles: synthesis, cytotoxicity, DNA binding and enzymatic inhibition studies. *New Journal of Chemistry*, v. 44, n. 45, p. 19891-19901, 2020.

DE OLIVEIRA, André Mauricio. Introdução à modelagem Molecular para Química, Engenharia e Biomédicas: fundamentos e exercícios. 1ª edição. Curitiba: Appris Editora, 2018.

DE SAVI, Chris; HUGHES, David L.; KVAERNO, Lisbet. Quest for a COVID-19 cure by repurposing small-molecule drugs: mechanism of action, clinical development, synthesis at scale, and outlook for supply. *Organic Process Research & Development*, v. 24, n. 6, p. 940-976, 2020.

DEANE, C. M.; BLUNDELL, T. L. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. London: Elsevier Academic Press, 2003.

DHORAJIWALA, Tehseen M.; HALDER, Sumit T.; SAMANT, Lalit. Comparative in silico molecular docking analysis of l-threonine-3-dehydrogenase, a protein target against African trypanosomiasis using selected phytochemicals. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, v. 6, n. 3, p. 101-108, 2019.

DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *Journal of health economics*, v. 47, p. 20-33, 2016.

DU, H.; GAO, J.; WENG, G.; DING, J.; CHAI, X.; PANG, J.; KANG, Y.; LI, D.; CAO, D. HOU, T. CovalentInDB: a comprehensive database facilitating the discovery of covalent inhibitors. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. D1, p. D1122-D1129, 2021.

DU, X.; LI, Y.; XIA, Y. L.; AI, S. M.; LIANG, J.; SANG, P.; JI, X-L.; LIU, S. Q. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.

ERVE, John C.L. Chemical toxicology: reactive intermediates and their role in pharmacology and toxicology. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 2, n. 6, p. 923-946, 2006.

EVANS, D. C.; WATT, A. P.; NICOLL-GRIFFITH, D. A.; BAILLIE, T. A. Drug– protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chemical research in toxicology*, v. 17, n. 1, p. 3-16, 2004.

FARIAS, R. L. et al. In vitro and in silico assessment of antitumor properties and biomolecular binding studies for two new complexes based on Ni<sup>II</sup> bearing k<sup>2</sup>N, S-donor ligands. *Materials Science and Engineering: C*, v. 121, p. 111815, 2021.

FERNÁNDEZ-PRADA, C.; DOUANNE, N.; MINGUEZ-MENENDEZ, A.; PENA, J.; TUNES, L. G.; PIRES, D. E.; MONTE-NETO, R. L. Repurposed molecules: A new hope in

tackling neglected infectious diseases. In: *In Silico Drug Design*. Academic Press, 2019. p. 119-160.

FERREIRA, Francis Barbosa. Planejamento baseado na estrutura da metaloprotease BPMP-I e avaliação de tiossemicarbazonas ativas contra a peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. 2016. Tese (PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, [Seropédica-RJ].

FERREIRA, Rafaela S.; GLAUCIUS, Oliva; ANDRICOPULO, Adriano D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *Química Nova*, v. 34, p. 1770-1778, 2011.

FOKOUÉ, H. H., PINHEIRO, P. S., FRAGA, C. A., SANT'ANNA, C. M. HÁ ALGO NOVO NO RECONHECIMENTO MOLECULAR APLICADO À QUÍMICA MEDICINAL?. *Química Nova*, v. 43, p. 78-89, 2020.

GEHRINGER, Matthias. Covalent inhibitors: back on track?. *Future Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 15, p. 1363-1368, 2020.

GOLDMAN, Jason D. et al. Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 19, p. 1827-1837, 2020.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Atracamento molecular. Em: *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. 1ª ed. São Paulo: SBBq, 2014.

GUEX, Nicolas; PEITSCH, Manuel C.; SCHWEDE, Torsten. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, v. 30, n. S1, p. S162-S173, 2009.

HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical reviews*, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

HEMPEL, T.; RAICH, L.; OLSSON, S.; AZOUZ, N. P.; KLINGLER, A. M.; HOFFMANN, M.; PÖHLMANN, S.; ROTHENBERG, M. E.; NOÉ, F. Molecular mechanism of inhibiting the SARS-CoV-2 cell entry facilitator TMPRSS2 with camostat and nafamostat. *Chemical Science*, v. 12, n. 3, p. 983-992, 2021.

HIFUMI, T., ISOKAWA, S., OTANI, N., ISHIMATSU, S. Adverse events associated with nafamostat mesylate and favipiravir treatment in COVID-19 patients. *Critical Care*, v. 24, n. 1, p. 1-2, 2020.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N-H; NITSCHKE, A.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HOFFMANN, M.; SCHROEDER, S.; KLEINE-WEBER, H.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: new treatment option for COVID-19. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 64, n. 6, p. e00754-20, 2020.

HOFFMANN, Markus et al. Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. *EBioMedicine*, v. 65, p. 103255, 2021.

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; PÖHLMANN, Stefan. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular cell*, v. 78, n. 4, p. 779-784. e5, 2020.

HU, X.; SHRIMP, J. H.; GUO, H.; XU, M.; CHEN, C. Z.; ZHU, W.; ZAKHAROV, A. V.; JAIN, S.; SHINN, P.; SIMEONOV, A.; HALL, M. D.; SHEN, M. Discovery of TMPRSS2 Inhibitors from Virtual Screening as a Potential Treatment of COVID-19. *ACS pharmacology & translational science*, 2021.

HUGHES, David L. Quest for a Cure: Potential Small-Molecule Treatments for COVID-19, Part 2. *Organic Process Research & Development*, v. 25, n. 5, p. 1089-1111, 2021.

IDRIS, M. O.; YEKEEN, A. A.; ALAKANSE, O. S.; DUROJAYE, O. A. Computer-aided screening for potential TMPRSS2 inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, molecular docking and molecular dynamics simulation approaches. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1-19, 2020.

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H. JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JACKSON, P. A.; WIDEN, J. C.; HARKI, D. A.; BRUMMOND, K. M. Covalent modifiers: A chemical perspective on the reactivity of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyls with thiols via hetero-Michael addition reactions. *Journal of medicinal chemistry*, v. 60, n. 3, p. 839-885, 2017.



JOHNSON, Douglas S.; WEERAPANA, Eranthie; CRAVATT, Benjamin F. Strategies for discovering and derisking covalent, irreversible enzyme inhibitors. *Future medicinal chemistry*, v. 2, n. 6, p. 949-964, 2010.

JOHNSON, M. S.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; BLUNDELL, T. L Knowledge-based protein modeling. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, v. 29, n. 1, p. 1-68, 1994.

KALGUTKAR, Amit S.; DALVIE, Deepak K. Drug discovery for a new generation of covalent drugs. *Expert opinion on drug discovery*, v. 7, n. 7, p. 561-581, 2012.

KAUR, U., CHAKRABARTI, S. S., OJHA, B., PATHAK, B. K., SINGH, A., SASO, L., CHAKRABARTI, S. Targeting host cell proteases to prevent SARS-CoV-2 invasion. *Current Drug Targets*, v. 22, n. 2, p. 192-201, 2021.

KIM, H. S., LEE, K. E., OH, J. H., JUNG, C. S., CHOI, D., KIM, Y., JEON, J. S., HAN, D. C., NOH, H. Cardiac arrest caused by nafamostat mesilate. *Kidney research and clinical practice*, v. 35, n. 3, p. 187-189, 2016.

KO, M., JEON, S., RYU, W. S., KIM, S. Comparative analysis of antiviral efficacy of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 in human lung cells. *Journal of medical virology*, v. 93, n. 3, p. 1403-1408, 2021.

KOLODZIK, A.; SCHNEIDER, N.; RAREY, M. *Structure-Based Virtual Screening In: Applied chemoinformatics: achievements and future opportunities*. John Wiley & Sons, 2018.

KUMAR, V.; DHANJAL, J. K.; BHARGAVA, P.; KAUL, A.; WANG, J.; ZHANG, H.; KAUL, S. C.; WADHWA, R.; SUNDAR, D. Withanone and Withaferin-A are predicted to interact with transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) and block entry of SARS-CoV-2 into cells. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1-13, 2020.

KUNTZ, I. D., BLANEY, J. M., OATLEY, S. J., LANGRIDGE, R., & FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of molecular biology*, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.

LAI, C. C.; CHEN, C. H.; WANG, C. Y.; CHEN, K. H.; WANG, Y. H.; HSUEH, P. R. Clinical efficacy and safety of remdesivir in patients with COVID-19: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021.

- LAM, D. K.; DANG, D.; FLYNN, A. N.; HARDT, M.; SCHMIDT, B. L. TMPRSS2, a novel membrane-anchored mediator in cancer pain. *Pain*, v. 156, n. 5, p. 923, 2015.
- LANGEDIJK, J.; MANTEL-TEEUWISSE, A. K.; SLIJKERMAN, D. S.; SCHUTJENS, M. H. D. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug discovery today*, v. 20, n. 8, p. 1027-1034, 2015.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993.
- LAU, S. K.; WOO, P. C.; LI, K. S.; HUANG, Y.; TSOI, H. W.; WONG, B. H.; WONG, S. S. Y.; LEUNG, S-Y.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 39, p. 14040-14045, 2005.
- LAVECCHIA, Antonio; DI GIOVANNI, Carmen. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current medicinal chemistry*, v. 20, n. 23, p. 2839-2860, 2013.
- LEACH, Andrew R. *Molecular modeling principles and applications*. 2<sup>a</sup> ed. London: Prentice Hall, 2001.
- LEACH, Andrew R.; GILLET, Valerie J. *An introduction to chemoinformatics*. Springer, 2007.
- LESK, Arthur M. *Introdução à bioinformática*. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- LI, Qingliang; SHAH, Salim. Structure-based virtual screening. In: *Protein Bioinformatics*. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 111-124.
- LI, Yvonne Y.; JONES, Steven J.M. Drug repositioning for personalized medicine. *Genome medicine*, v. 4, n. 3, p. 1-14, 2012.
- LIAO, C.; PEACH, M. L.; YAO, R.; NICKLAUS, M. C. Molecular docking and structure-based virtual screening. In: *In silico drug discovery & design*. Future Science Ltd, 2013.
- LIONTA, E.; SPYROU, G.; K VASSILATIS, D.; COURNIA, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 14, n. 16, p. 1923-1938, 2014.
- LOVELL, S. C.; DAVIS, I. W.; ARENDALL, W. B. III; DE BAKKER, P. I. W.; WORD, J. M.; PRISANT, M. G.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure validation by

C $\alpha$  geometry:  $\phi$ ,  $\psi$  and C $\beta$  deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 50, n. 3, p. 437-450, 2003.

MAH, Robert; THOMAS, Jason R.; SHAFER, Cynthia M. Drug discovery considerations in the development of covalent inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 24, n. 1, p. 33-39, 2014.

MAIA, E. H. B.; ASSIS, L. C.; DE OLIVEIRA, T. A.; DA SILVA, A. M.; TARANTO, A. G. Structure-based virtual screening: from classical to artificial intelligence. *Frontiers in chemistry*, v. 8, p. 343, 2020.

MARIANI, V.; BIASINI, M.; BARBATO, A.; SCHWEDE, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*, v. 29, n. 21, p. 2722-2728, 2013.

MARUYAMA, Y., YOSHIDA, H., UCHINO, S., YOKOYAMA, K., YAMAMOTO, H., TAKINAMI, M., HOSOYA, T. Nafamostat mesilate as an anticoagulant during continuous veno-venous hemodialysis: a three-year retrospective cohort study. *The International journal of artificial organs*, v. 34, n. 7, p. 571-576, 2011.

MASTERS, Paul S. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, v. 66, p. 193-292, 2006.

MATHER, B. D.; VISWANATHAN, K.; MILLER, K. M.; LONG, T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 5, p. 487-531, 2006.

MATSUYAMA, S.; Nagata, N.; Shirato, K.; Kawase, M.; Takeda, M.; Taguchi, F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *Journal of virology*, v. 84, n. 24, p. 12658-12664, 2010.

MEYER, D.; SIELAFF, F.; HAMMAMI, M.; BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER, E.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T. Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochemical Journal*, v. 452, n. 2, p. 331-343, 2013.

MIDGLEY, I., HOOD, A. J., PROCTOR, P., CHASSEAUD, L. F., IRONS, S. R., CHENG, K. N., BRINDLEY, C. J., BONN, R. Metabolic fate of <sup>14</sup>C-camostat mesylate in man, rat and dog after intravenous administration. *Xenobiotica*, v. 24, n. 1, p. 79-92, 1994.

MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J.; CORBEIL, A. C. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British journal of pharmacology*, v. 153, n. S1, p. S7-S26, 2008.

MUNSAMY, Geraldene; SOLIMAN, Mahmoud ES. Homology modeling in drug discovery- an update on the last decade. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 14, n. 9, p. 1099-1111, 2017.

MURGOLO, Nicholas et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. *PLoS Pathogens*, v. 17, n. 2, p. e1009225, 2021.

MUTO, Shigeaki; IMAI, Masashi; ASANO, Yasushi. Mechanisms of the hyperkalaemia caused by nafamostat mesilate: effects of its two metabolites on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *British journal of pharmacology*, v. 111, n. 1, p. 173-178, 1994.

NASCIMENTO, Igor José Dos Santos; DA SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira; DE AQUINO, Thiago Mendonça. Molecular Modeling Targeting Transmembrane Serine Protease 2 (TMPRSS2) as an Alternative Drug Target Against Coronaviruses. *Current drug targets*, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOSENGO, Nicola. Can you teach old drugs new tricks?. *Nature News*, v. 534, n. 7607, p. 314, 2016.

ONO PHARMACEUTICAL. Foipan Camostat Mesilate Oral Tablets, 2009. Disponível em: <<http://www.shijiebiaopin.net/upload/product/201272318373223.PDF>>. Acesso em: 09 de abril de 2022.

ORRY, Andrew J.W.; ABAGYAN, Ruben. *Homology modeling: methods and protocols*. New York: Humana Press, 2012.

ORTEGA-PAZ, L., CAPODANNO, D., MONTALESCOT, G., & ANGIOLILLO, D. J. Coronavirus disease 2019-associated thrombosis and coagulopathy: Review of the pathophysiological characteristics and implications for antithrombotic management. *Journal of the American Heart Association*, v. 10, n. 3, p. e019650, 2021.

OU, Xiuyuan et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

OUR WORLD IN DATA. Coronavirus (COVID-19) Cases, 2022. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/covid-cases>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

PARK, Kyungsoo. A review of computational drug repurposing. *Translational and Clinical Pharmacology*, v. 27, n. 2, p. 59-63, 2019.

PASSOS, G.F.S.; GOMES, M.G.M.; AQUINO, T.M.D.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.D.; SOUZA, S.J.M.D.; CAVALCANTE, J.P.M.; SANTOS, E.C.D.; BASSI, Ê.J.; SILVA-JÚNIOR, E.F.D. Computer-aided design, synthesis, and antiviral evaluation of novel acrylamides as potential inhibitors of E3-E2-E1 glycoproteins complex from Chikungunya virus. *Pharmaceuticals*, v. 13, n. 7, p. 141, 2020.

PATRICK, Graham L. *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford university press, 2013.

PERLMUTTER, P. *Conjugate addition reactions in organic synthesis*. Elsevier, 1992.

POROIKOV, Vladimir; DRUZHILOVSKIY, Dmitry. Drug Repositioning: New Opportunities for Older Drugs. In: *In Silico Drug Design*. Academic Press, p. 3-17, 2019.

POTASHMAN, Michele H.; DUGGAN, Mark E. Covalent modifiers: an orthogonal approach to drug design. *Journal of medicinal chemistry*, v. 52, n. 5, p. 1231-1246, 2009.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2019.

RAMACHANDRAN, GN. T.; SASISEKHARAN, V. Conformation of polypeptides and proteins. *Advances in protein chemistry*, v. 23, p. 283-437, 1968.

RAMOS, O. H. P. Predições estruturais com base em homologia. In: *Métodos em Toxinologia: toxinas de serpentes*. São Carlos: EdUFSCar, 2007.

REDDY, C. K.; CHIANG, H.-D. A Stability Boundary Based Method for Finding Saddle Points on Potential Energy Surfaces. *Journal of computational biology*, v. 13, n. 3, p. 745-66, 2006.

REIS, Rodrigo Souza Silva Valle dos. Avaliação in silico de fármacos comerciais para reposicionamento na terapêutica da tuberculose. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

REST, Joshua S.; MINDELL, David P. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, n. 3, p. 219-225, 2003.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Revista Virtual de Química*, v. 4, n. 6, p. 739-776, 2012.

ROESSLER, H. I.; KNOERS, N. V.; VAN HAELST, M. M.; VAN HAAFTEN, G. Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 42, n. 04, p. 255-267, 2021.

SAHU, N. U.; SHAH, C. P.; MACHHAR, J. S.; KHARKAR, P. S. Drug Repurposing in Search of Anti-Infectives: Need of the Hour in the Multidrug Resistance Era!. In: *In Silico Drug Design*. Academic Press, 2019. p. 399-426.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 49-57, 2009.

SANTOS FILHO, Osvaldo Andrade; ALENCASTRO, Ricardo Bicca de. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, v. 26, p. 253-259, 2003.

SAXENA, A.; SANGWAN, R. S.; MISHRA, S. Fundamentals of Homology Modeling Steps and Comparison among Important Bioinformatics Tools: An Overview. *Science International*, v. 1, n. 7, 2013.

SCHWÖBEL, J. A.; KOLEVA, Y. K.; ENOCH, S. J.; BAJOT, F.; HEWITT, M.; MADDEN, J. C.; ROBERTS, D. W.; SCHULTZ, T. W.; CRONIN, M. T. Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology. *Chemical reviews*, v. 111, n. 4, p. 2562-2596, 2011.

SHAHLAEI, M.; MADADKAR-SOBHANI, A.; MAHNAM, K.; FASSIHI, A.; SAGHAIE, L.; MANSOURIAN, M. Homology modeling of human CCR5 and analysis of its binding properties through molecular docking and molecular dynamics simulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1808, n. 3, p. 802-817, 2011.

SHARMA, V.; WAKODE, S.; KUMAR, H. Structure-and ligand-based drug design: concepts, approaches, and challenges. In: *Chemoinformatics and Bioinformatics in the Pharmaceutical Sciences*. Academic Press, 2021. p. 27-53.

SHIRATO, K.; KAWASE, M.; MATSUYAMA, S. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *Journal of virology*, v. 87, n. 23, p. 12552-12561, 2013.

SHRIMP, J. H.; KALES, S. C.; SANDERSON, P. E.; SIMEONOV, A.; SHEN, M.; HALL, M. D. An enzymatic TMPRSS2 assay for assessment of clinical candidates and discovery of inhibitors as potential treatment of COVID-19. *ACS pharmacology & translational science*, v. 3, n. 5, p. 997-1007, 2020.

SILVEIRA, N. J. F. Bioinformática estrutural aplicada ao estudo de proteínas alvo do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. Defesa de Tese de Doutorado em Biofísica Molecular. Universidade Estadual Paulista (Unesp), São Paulo, 2005. p. 1-166.

SINGH, J.; PETTER, R. C.; BAILLIE, T. A.; WHITTY, A. The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews Drug discovery*, v. 10, n. 4, p. 307-317, 2011.

SOHRABI, C.; ALSAFI, Z.; O'NEILL, N.; KHAN, M.; KERWAN, A.; AL-JABIR, A.; IOSIFIDIS, C.; AGHA, R. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *International journal of surgery*, v. 76, p. 71-76, 2020.

SOTRIFFER, Christoph A. Protein-ligand docking: from basic principles to advanced applications. In *Silico Drug Discovery and Design: Theory, Methods, Challenges, and Applications*, capítulo 6, v. 6, 2016.

SOUSA, Sergio Filipe; FERNANDES, Pedro Alexandrino; RAMOS, Maria Joao. Protein–ligand docking: current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 65, n. 1, p. 15-26, 2006.

STAHL, Martin. Structure-Based Library Design. In: *Virtual screening for bioactive molecules*, vol. 10, p. 229-264, 2000.

STAHURA, Florence L.; BAJORATH, Jürgen. New methodologies for ligand-based virtual screening. *Current pharmaceutical design*, v. 11, n. 9, p. 1189-1202, 2005.

STRELOW, John M. A perspective on the kinetics of covalent and irreversible inhibition. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D*, v. 22, n. 1, p. 3-20, 2017.

STUDER, G.; REMPFER, C.; WATERHOUSE, A. M.; GUMIENNY, R.; HAAS, J.; SCHWEDE, T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, v. 36, n. 6, p. 1765-1771, 2020.

SURYANARAYANAN, V.; PANWAR, U.; CHANDRA, I.; SINGH, S. K. De Novo Design of Ligands Using Computational Methods. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), v. 1762, p. 71-86, 2018.

SUTANTO, Fandi; KONSTANTINIDOU, Markella; DÖMLING, Alexander. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery. *RSC medicinal chemistry*, v. 11, n. 8, p. 876-884, 2020.

THARAPPEL, A. M.; SAMRAT, S. K.; LI, Z.; LI, H. Targeting crucial host factors of SARS-CoV-2. *ACS Infectious Diseases*, v. 6, n. 11, p. 2844-2865, 2020.

THUNDERS, Michelle; DELAHUNT, Brett. Gene of the month: TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). *Journal of clinical pathology*, v. 73, n. 12, p. 773-776, 2020.

TIAN, D.; LIU, Y.; LIANG, C.; XIN, L.; XIE, X.; ZHANG, D.; WAN, M.; LI, H.; FU, X.; LIU, H.; CAO, W. An update review of emerging small-molecule therapeutic options for COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, p. 111313, 2021.

TORRES, P. H.; SODERO, A. C.; JOFILY, P.; SILVA-JR, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 18, p. 4574, 2019.

UZUNIAN, Armênio. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, 2020.

VINAYAGAM, Sathishkumar; SATTU, Kamaraj. SARS-CoV-2 and coagulation disorders in different organs. *Life Sciences*, p. 118431, 2020.

WANG, M. Y.; ZHAO, R.; GAO, L. J.; GAO, X. F.; WANG, D. P.; CAO, J. M. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, 2020.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research*, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.



WEISS, J.; BAJRAKTARI-SYLEJMANI, G.; HAEFELI, W.E. Low risk of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesylate and its metabolite GBPA to act as perpetrators of drug-drug interactions. *Chem Biol Interact.* 2021.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2021. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 27 de dezembro de 2021.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022. Disponível em: <<https://covid19.who.int/region/amro/country/br>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Coronavirus disease (COVID-19), 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3)>. Acesso em: 27 de dezembro de 2021.

XIA, Shuai et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell research*, v. 30, n. 4, p. 343-355, 2020.

YAMAMOTO, Mizuki et al. The anticoagulant nafamostat potently inhibits SARS-CoV-2 S protein-mediated fusion in a cell fusion assay system and viral infection in vitro in a cell-type-dependent manner. *Viruses*, v. 12, n. 6, p. 629, 2020.

YAMAMOTO, M., MATSUYAMA, S., LI, X., TAKEDA, M., KAWAGUCHI, Y., INOUE, J. I., & MATSUDA, Z. Identification of nafamostat as a potent inhibitor of Middle East respiratory syndrome coronavirus S protein-mediated membrane fusion using the split-protein-based cell-cell fusion assay. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 60, n. 11, p. 6532-6539, 2016.

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

ZHOU, S.; CHAN, E., DUAN, W.; HUANG, M.; CHEN, Y. Z. Drug bioactivation covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug metabolism reviews*, v. 37, n. 1, p. 41-213, 2005.

ZHOU, Yanchen et al. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral research*, v. 116, p. 76-84, 2015.

ZHU, H.; DU, W.; SONG, M.; LIU, Q.; HERRMANN, A.; HUANG, Q. Spontaneous binding of potential COVID-19 drugs (Camostat and Nafamostat) to human serine protease TMPRSS2. *Computational and structural biotechnology journal*, v. 19, p. 467-476, 2021.

ZHURAVEL, S. V., KHMELNITSKIY, O. K., BURLAKA, O. O., GRITSAN, A. I., GOLOSHCHEKIN, B. M., KIM, S., HONG, K. Y. Nafamostat in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19 pneumonia: A randomised Phase II clinical trial. *EClinicalMedicine*, v. 41, p. 101169, 2021.

## APÊNDICE A

Tabelas referentes as análises de inspeção visual e de dados estatísticos do processo de validação da metodologia de ancoragem molecular.

**Tabela 3 – Dados dos dockings com o pdb 7MQE.**

TMPRSS2 – PDB 7MEQ							Interações com resíduos essenciais		
Código	Docking score 01	Docking score 02	Docking score 03	Média	Desvio Padrão	Coef. De variação	Resíduo Ser441	Resíduo His296	Resíduo Asp345
ini01	22,0681	21,2293	21,5304	21,6093	0,4249	1,97%	H bond	Amide-Pi Stacked	-
ini02	28,8094	29,2589	29,0465	29,0383	0,2249	0,77%	Van der Waals	H bond	-
ini03	21,2339	21,6314	21,8089	21,5581	0,2944	1,37%	H bond	Amide-Pi Stacked	-
ini04	21,9496	19,8904	20,1538	20,6646	1,1206	5,42%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini05	25,955	26,1405	25,5463	25,8806	0,3040	1,17%	H bond	Pi-Sulfur	-
ini06	29,0881	29,3533	30,0205	29,4873	0,4804	1,63%	C-H bond; Pi-Donor H bond	Amide-Pi Stacked; Pi-Pi T-Shaped	-
ini07	17,2804	17,2264	15,8087	16,7718	0,8345	4,98%	H bond	Van der Waals	-
ini08	17,8827	18,7975	17,2685	17,9829	0,7694	4,28%	-	-	-
ini09	38,5651	33,777	35,2078	35,8500	2,4578	6,86%	Van der Waals	H bond	-
ini10	31,9758	27,8372	30,1694	29,9941	2,0749	6,92%	Van der Waals	-	-
ini11	23,2726	24,2579	23,1781	23,5695	0,5980	2,54%	H bond	H bond	-
ini12	29,9456	27,7093	30,5403	29,3984	1,4927	5,08%	H bond	C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini13	25,7847	25,6572	28,842	26,7613	1,8031	6,74%	H bond	Pi-Alkyl	-
ini14	22,736	22,7917	24,3332	23,2870	0,9065	3,89%	H bond	H bond; Amide-Pi Stacked; Pi-Pi T-Shaped	-
ini15	24,4017	24,1995	24,1913	24,2642	0,1192	0,49%	H bond	C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini16	18,2947	18,2604	17,51	18,0217	0,4435	2,46%	H bond	H bond; Pi-Cation	-

ini17	24,0457	23,4515	23,1471	23,5481	0,4570	1,94%	Van der Waals	Pi-Pi Stacked; Pi-Pi T-Shaped	-
ini18	21,2222	21,277	21,0207	21,1733	0,1350	0,64%	-	-	-
ini19	21,1542	20,8135	19,0427	20,3368	1,1336	5,57%	-	C-H bond	-
ini20	18,6788	22,3958	21,1294	20,7347	1,8897	9,11%	-	-	-
ini21	17,1728	17,1223	18,2059	17,5003	0,6116	3,49%	-	-	-
ini22	20,2805	19,5077	18,7967	19,5283	0,7421	3,80%	Van der Waals	Pi-Pi Stacked; Pi-Pi T-Shaped	-
ini23	19,4085	19,018	19,1062	19,1776	0,2048	1,07%	-	-	-
ini24	32,4884	33,6683	31,5771	32,5779	1,0485	3,22%	Van der Waals	-	-
ini25	30,0737	29,3339	31,6979	30,3685	1,2093	3,98%	Van der Waals	-	-
ini26	33,2267	35,5106	36,0229	34,9201	1,4887	4,26%	Van der Waals	-	-
ini27	32,3962	30,2523	31,5273	31,3919	1,0783	3,44%	Van der Waals	H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini28	26,4031	30,4267	27,9488	28,2595	2,0297	7,18%	H bond	Van der Waals	-
ini29	26,8004	27,7188	28,4476	27,6556	0,8254	2,98%	-	Van der Waals	-
ini30	26,5326	25,2437	25,2479	25,6747	0,7429	2,89%	H bond	Pi-Alkyl	-
ini31	27,6682	28,4203	27,8353	27,9746	0,3949	1,41%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini32	22,3366	22,4353	22,453	22,4083	0,0627	0,28%	-	-	-
ini33	23,8743	26,8699	30,1635	26,9692	3,1458	11,66%	C-H bond	Van der Waals	-
ini34	25,8651	26,4206	28,3671	26,8843	1,3139	4,89%	H bond	Van der Waals	-
ini35	19,2535	21,2112	22,5226	20,9958	1,6452	7,84%	-	-	-
ini36	26,7189	31,3898	25,1264	27,7450	3,2553	11,73%	Van der Waals	C-H bond; Pi-Alkyl	-
ini37	27,3712	31,0765	38,2817	32,2431	5,5480	17,21%	H bond	Pi-Alkyl	-
ini38	25,2513	27,1652	28,8092	27,0752	1,7807	6,58%	H bond	Pi-Sulfur	-
ini39	27,1762	27,3704	29,8768	28,1411	1,5063	5,35%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped	-
ini40	28,9691	26,2059	32,6525	29,2758	3,2342	11,05%	Van der Waals	H bond	-
ini41	24,65	24,65	24,6199	24,6400	0,0174	0,07%	H bond	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini42	24,4931	28,1679	24,0722	25,5777	2,2530	8,81%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini43	28,9625	32,3007	22,5413	27,9348	4,9602	17,76%	H bond	Pi-Alkyl	-

ini44	26,8429	26,5037	27,3167	26,8878	0,4084	1,52%	Van der Waals	Pi-Cation; Attractive Charge	Pi-Cation; Attractive Charge
ini45	25,3431	25,9174	25,8703	25,7103	0,3188	1,24%	Van der Waals	-	-
ini46	29,8216	26,004	31,635	29,1535	2,8743	9,86%	Van der Waals	-	-
ini47	25,4105	23,8763	25,4616	24,9161	0,9009	3,62%	-	-	-
ini48	20,0243	20,6307	23,0282	21,2277	1,5885	7,48%	H bond	Van der Waals	-
ini49	20,4827	19,4103	22,5834	20,8255	1,6141	7,75%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini50	20,2504	19,574	21,9162	20,5802	1,2054	5,86%	H bond	Van der Waals	-
ini51	10,0287	15,7218	13,017	12,9225	2,8477	22,04%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped; C-H bond	-
ini52	22,0698	22,6487	22,8683	22,5289	0,4125	1,83%	H bond	Van der Waals	-
ini53	20,0488	22,4988	21,9188	21,4888	1,2804	5,96%	Van der Waals	Pi-Pi Stacked	-
ini54	21,378	20,4284	20,5262	20,7775	0,5223	2,51%	Van der Waals	H bond	-
ini55	18,9522	21,755	21,1451	20,6174	1,4740	7,15%	H bond	C-H bond	-
ini56	16,3647	16,3623	15,9172	16,2147	0,2577	1,59%	Van der Waals	-	-
ini57	25,1874	22,5487	25,1625	24,2995	1,5163	6,24%	H bond	H bond; Pi-Sulfur	-
ini58	21,8042	19,7477	22,5223	21,3581	1,4401	6,74%	Van der Waals	Pi-Pi T-Shaped; Pi-Pi Stacked	-
ini59	23,2901	24,2903	22,7517	23,4440	0,7808	3,33%	-	-	-
ini60	15,8354	20,5678	23,4156	19,9396	3,8289	19,20%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini61	21,3292	22,0843	22,6935	22,0357	0,6834	3,10%	H bond	Van der Waals	-
ini62	13,1547	11,9532	14,6703	13,2594	1,3616	10,27%	Van der Waals	Van der Waals	-

**Tabela 4 – Dados dos dockings com o pdb da enzima homóloga.**

TMRSS2 – PDB Homólogo							Interações com resíduos essenciais		
Código	Docking score 01	Docking score 02	Docking score 03	Média	Desvio Padrão	Coef. De Variação	Resíduo Ser441	Resíduo His296	Resíduo Asp345
ini01	23,0215	23,7784	21,8956	22,8985	0,7736	3,38%	H bond	Van der Waals	-
ini02	31,7305	31,4228	31,3712	31,5082	0,1586	0,50%	Van der Waals	H bond	-
ini03	21,2393	20,7502	21,4025	21,1307	0,2772	1,31%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped	-
ini04	22,4565	20,6971	22,1692	21,7743	0,7706	3,54%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini05	25,0485	24,1508	24,6024	24,6006	0,3665	1,49%	H bond	Pi-Pi T-Shaped	-
ini06	27,8024	26,1655	26,0862	26,6847	0,7910	2,96%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini07	20,6467	19,9181	20,7123	20,4257	0,3599	1,76%	H bond	H bond	-
ini08	18,0384	18,7442	19,0355	18,6060	0,4186	2,25%	H bond	Van der Waals	-
ini09	36,5201	37,134	37,5849	37,0797	0,4364	1,18%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini10	31,3725	34,0914	26,8707	30,7782	2,9776	9,67%	H bond	Pi-Alkyl	-
ini11	19,5595	22,7284	21,7376	21,3418	1,3236	6,20%	H bond	C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini12	30,081	29,7045	29,8329	29,8728	0,1563	0,52%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini13	28,1837	28,1605	27,6825	28,0089	0,2310	0,82%	H bond	Van der Waals	-
ini14	24,5769	25,6818	28,7255	26,3281	1,7542	6,66%	H bond	Amide-Pi Stacked; Pi-Pi Stacked	H bond
ini15	26,4629	26,8917	28,2813	27,2120	0,7761	2,85%	H bond	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini16	17,406	17,2331	17,4507	17,3633	0,0938	0,54%	Van der Waals	Pi-Alkyl	-
ini17	25,7978	25,1847	25,4652	25,4826	0,2506	0,98%	Van der Waals	Pi-Pi T-Shaped; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini18	21,0087	20,3115	20,7686	20,6963	0,2892	1,40%	H bond	C-H bond	-
ini19	21,5134	21,51	21,58	21,5345	0,0322	0,15%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini20	18,61	18,8886	19,1253	18,8746	0,2106	1,12%	Van der Waals	Pi-Sigma	-
ini21	21,4979	21,1028	21,3371	21,3126	0,1622	0,76%	H bond	H bond	-
ini22	17,8677	19,5217	19,4498	18,9464	0,7633	4,03%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	-

ini23	18,7599	18,5298	18,5499	18,6132	0,1041	0,56%	H bond	Pi-Sulfur; Amide-Stacked; Pi-Pi T-Shaped	-
ini24	33,0279	35,1806	32,9427	33,7171	1,0355	3,07%	Van der Waals	-	-
ini25	30,558	40,1762	37,957	36,2304	4,1120	11,35%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped; Pi-sulfur	-
ini26	34,5401	31,0591	33,7228	33,1073	1,4863	4,49%	Van der Waals	H bond; Pi-Pi T-Shaped; Amide-Pi Stacked	Van der Waals
ini27	34,2706	28,5557	32,1665	31,6643	2,3600	7,45%	-	H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini28	31,5848	30,4416	31,8592	31,2952	0,6139	1,96%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped; Amide-Pi Stacked	Van der Waals
ini29	26,0588	25,0579	26,2799	25,7989	0,5317	2,06%	H bond	Pi-Pi Stacked; Pi-Pi T-Shaped; Amide-Pi Stacked	-
ini30	21,155	22,8041	23,547	22,5020	0,9996	4,44%	H bond	Van der Waals	-
ini31	29,7592	31,6593	27,95	29,7895	1,5145	5,08%	H bond	H bond; Pi-Pi T-Shaped; Pi-sulfur	-
ini32	21,2358	18,7933	18,9936	19,6742	1,1072	5,63%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini33	27,6637	29,8678	28,5971	28,7095	0,9033	3,15%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	Van der Waals
ini34	25,4842	24,9741	25,003	25,1538	0,2339	0,93%	H bond	H bond; Alkyl; Pi-Alkyl; Pi-Sulfur	Van der Waals
ini35	21,0287	19,4169	25,574	22,0065	2,6070	11,85%	H bond	H bond; Alky; Pi-Alkyl; Pi-Sulfur	Van der Waals
ini36	32,1499	28,15	34,8463	31,7154	2,7510	8,67%	C-H bond	Alkyl; Pi-Alkyl	Van der Waals
ini37	26,7357	28,3243	27,9541	27,6714	0,6787	2,45%	H bond	C-H bond; Pi-Alkyl; Pi-Pi T-Shaped;	-

								Pi-Pi Stacked	
ini38	29,5077	26,2717	29,5222	28,4339	1,5289	5,38%	H bond	Van der Waals	-
ini39	27,5157	28,8356	27,4288	27,9267	0,6437	2,30%	H bond	C-H bond; Pi-Alkyl; Pi-Sulfur	-
ini40	28,5252	31,7907	29,3974	29,9044	1,3805	4,62%	H bond	H bond	-
ini41	24,6935	22,9279	25,2626	24,2947	0,9940	4,09%	Van der Waals	C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl; Pi-Pi T-Shaped; Amide-Pi Stacked	Van der Waals
ini42	28,1339	29,0263	26,7808	27,9803	0,9231	3,30%	Van der Waals	Pi-Alkyl	-
ini43	28,8698	32,6685	28,4687	30,0023	1,8924	6,31%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini44	24,2207	24,4849	26,134	24,9465	0,8466	3,39%	H bond	H bond; Alkyl; Pi-Alkyl; Pi-Sulfur	-
ini45	24,8623	27,2059	22,8022	24,9568	1,7990	7,21%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini46	29,0119	31,5904	29,024	29,8754	1,2127	4,06%	C-H bond; Pi-Donor H bond	Alkyl; Pi-Alkyl	Van der Waals
ini47	23,2544	28,0813	26,4963	25,9440	2,0089	7,74%	C-H bond	Pi-Alkyl	-
ini48	24,2043	19,8072	23,7294	22,5803	1,9704	8,73%	Van der Waals	C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl; Pi-Sulfur	Van der Waals
ini49	21,053	22,6102	18,207	20,6234	1,8231	8,84%	H bond	H bond; C-H bond; Alkyl; Pi-Alkyl	-
ini50	27,4958	21,3071	22,7533	23,8521	2,6433	11,08%	H bond	H bond; C-H bond; Pi-Sulfur	-
ini51	10,3176	10,9537	12,371	11,2141	0,8583	7,65%	H bond	Van der Waals	-
ini52	18,306	29,1024	19,9415	22,4500	4,7511	21,16%	Van der Waals	Pi-Alkyl	-
ini53	19,9408	18,6082	22,7231	20,4240	1,7143	8,39%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini54	22,1305	21,2993	21,0013	21,4770	0,4778	2,22%	H bond	Pi-Sulfur	-



ini55	21,6927	23,0849	16,2882	20,3553	2,9315	14,40%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini56	17,326	17,3275	18,9812	17,8782	0,7799	4,36%	Van der Waals	Van der Waals	-
ini57	19,8446	20,6199	21,0553	20,5066	0,5007	2,44%	H bond	Van der Waals	-
ini58	22,3801	22,0022	26,71	23,6974	2,1358	9,01%	H bond	Pi-Alkyl	-
ini59	21,5479	23,4865	24,0205	23,0183	1,0623	4,62%	H bond	H bond	-
ini60	16,184	19,8858	13,4885	16,5194	2,6224	15,87%	H bond	Pi-Sulfur	-
ini61	17,6926	24,9003	23,172	21,9216	3,0725	14,02%	Van der Waals	Alkyl; Pi-Alkyl	Van der Waals
ini62	12,253	11,5276	13,1308	12,3038	0,6555	5,33%	H bond	Pi-Sulfur	-