

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 02/04/2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Tamara de Carvalho

**ESTUDO DA AÇÃO *IN VITRO* DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS  
COMO ANTIVIRAIS CONTRA O SARS-CoV-2**

São José do Rio Preto

2024

Tamara de Carvalho

**ESTUDO DA AÇÃO *IN VITRO* DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS  
COMO ANTIVIRAIS CONTRA O SARS-CoV-2**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon

Coorientadores: Profa. Dra. Paula Rahal

Dra. Cintia Bittar

São José do Rio Preto

2024

Carvalho, Tamara de  
C331e      Estudo da ação in vitro de peptídeos sintéticos como antivirais contra o SARS-CoV-2 / Tamara de Carvalho. -- São José do Rio Preto, 2024

165 p. : il.

Tese (doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Marília de Freitas Calmon  
Coorientadora: Paula Rahal  
Coorientadora: Cintia Bittar

1. SARS-CoV-2. 2. Antiviral. 3. Peptídeos. 4. Mecanismo de ação. I. Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tamara de Carvalho

## **ESTUDO DA AÇÃO *IN VITRO* DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS COMO ANTIVIRAIS CONTRA O SARS-CoV-2**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

### Comissão Examinadora

#### TITULARES

1. Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon

Unesp, Câmpus de São José do Rio Preto

Orientadora

2. Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro

Universidade Federal de Rondonópolis

3. Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Fernandes Campos

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-Famerp

4. Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

Unesp, Câmpus de São José do Rio Preto

5. Prof. Dr. Flávio da Silva Emery

USP- Câmpus de Ribeirão Preto

SUPLENTES1. Dr. Vivaldo Gomes da Costa

São José do Rio Preto

02 de Abril de 2024

Dedico este trabalho à meus pais Sueli Silva de Carvalhoe Wilson de Carvalho Júnior, e meus irmãos Tamires de Carvalho e Raphael de Carvalho, por sempre me apoiarem e incentivarem.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente minha família, meus pais Sueli Silva de Carvalho e Wilson de Carvalho Júnior, e meus irmãos Raphael de Carvalho e Tamires de Carvalho, que sempre estiveram presentes e me apoiaram em todos os momentos. Nossa união e amor me faz uma pessoa mais forte cada dia. E também ao meu sobrinho, Miguel, que com apenas dois aninhos faz meus dias mais alegres e especiais.

Minha orientadora Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, que me orienta desde a iniciação científica. Sou imensamente grata pela oportunidade de ser sua aluna, e todos seus ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento dos projetos nesses anos. Muito obrigada por sempre me incentivar a buscar mais e dar meu melhor;

Minhas coorientadoras, Profa. Dra. Paula Rahal, muito obrigada por ter me recebido no laboratório desde a iniciação científica e por todo conhecimento adquirido e apoio. E Profa. Dra. Cíntia Bittar, muito obrigada por todo conhecimento repassado e por todo apoio recebido. Sou muito grata de ser aluna de vocês e ter aprendido tanto;

À meu coorientador durante meu período de doutorado sanduíche, Prof. Dr. Mark Harris por ter me recebido em seu laboratório. Muito obrigada por todo conhecimento adquirido, oportunidades, e assistência durante todo o processo de desenvolvimento do projeto;

À todos os meus colegas e amigos membros atuais e anteriores do Laboratório de Estudos Genômicos, sou muita grata por fazer parte de um grupo tão unido e especial, composto de excelentes pesquisadores. À Gabriela, Pâmela, Dayla, Maria Letícia, Camila, Ana Júlia, Paola, Thalissa, Yasmin, Isabella, Mariah, Vivaldo, pelo convívio diário, troca de conhecimentos, conversas, e apoio. Muito obrigada pela amizade de vocês;

Às minhas amigas, Marilê, Dayla e Pâmela por todos esses anos de amizade, apoio e risadas. Vou levar pra sempre comigo a amizade incrível de vocês. Obrigada por tudo;

To my friends that supported me so much during my time in the UK, Francesca, Moises, Upasana, Queen, for all our scientific chats, fun times, company, and coffees shared;

To my friends Victoria Hsiao and Ilaria Perriu for all the support and our fun moments together, thanks for making my life in the UK so joyful;

Thank you, Victoria Hsiao, for all our adventures in the UK and introducing me to the best bubble tea I tried so far. I know the best one, I will have when I go to Taiwan;

Thank you to my partner Thomas Keogan for all the support and friendship. Thank you for always being present and making me laugh;

To all Mark Harris's group members, Grace, Upasana, Anya, Molly, Harry, Gem, Ryan, Suki, for the support and all the help during my time in the lab;

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, do laboratório de Síntese, Estrutura e Aplicação de Biomoléculas (LASEBio), do Instituto de Química e o Prof. Dr. Paulo Ricardo da Silva Sanches, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos da UNESP campus Araraquara, e equipe pelo desenvolvimento dos peptídeos e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho;

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", que já posso chamar de minha segunda casa após tantos anos aqui. Sou imensamente grata pela oportunidade de ter realizado minha formação nessa Universidade;

Sou imensamente grata por todos os colaboradores desse trabalho, muito obrigada pela colaboração e oportunidade de trabalhar com cada um. ;

À comissão examinadora: Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro, Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Fernandes Campos, Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior, Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, membros titulares da banca; e aos suplentes: Prof. Dr. Vivaldo Gomes da Costa, Profa. Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi e Profa. Dra. Isadora Alonso Corrêa; por aceitarem nosso convite, suas contribuições são essenciais para nosso trabalho;

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

"A cachorra Baleia acompanhou-o naquela hora difícil. Repousava junto à trempe, cochilando no calor, à espera de um osso. Provavelmente não o receberia, mas acreditava nos ossos, e o torpor que a embalava era doce. Mexia-se de longe em longe, punha na dona as pupilas negras onde a confiança brilhava. Admitia a existência de um osso graúdo na panela, e ninguém lhe tirava esta certeza, nenhuma inquietação lhe perturbava os desejos moderados. Às vezes recebia pontapés sem motivo. Os pontapés estavam previstos e não dissipavam a imagem do osso."

VIDAS SECAS, 1938, Graciliano Ramos.

## RESUMO

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) é o agente causador da Covid-19, e os primeiros casos de pacientes diagnosticados com essa doença foram na China, em dezembro de 2019. Em março de 2020, devido ao aumento expressivo no número de infectados por todo o mundo, a Organização Mundial da Saúde declarou que estávamos vivendo um quadro pandêmico. Apesar de já existir vacina para esse vírus, ainda há necessidade de desenvolvimento de tratamento no caso de pacientes graves ou imunocomprometidos. Diante do grande problema de saúde pública mundial que o vírus SARS-CoV-2 representa, juntamente com o potencial de estudos com peptídeos antivirais, o objetivo do presente trabalho foi identificar e investigar o potencial de peptídeos inibidores de infecção por SARS-CoV-2. Para isso, três questões foram elaboradas em torno do dímero (MR1903): 1) Como a dimerização dos peptídeos está relacionada com a ação anti-SARS-CoV-2? Para responder essa questão, outros três peptídeos foram elaborados com diferentes padrões de dimerização (PE1940, MR2024, EMC2109); 2) A adição de peptídeos com característica de penetração celular pode resultar num aumento da atividade antiviral contra SARS-CoV-2? E a partir disso, outros dois peptídeos foram desenvolvidos (MC1937 e MC1947); 3) A dextrorotação do peptídeo dimerico mantém sua atividade? E por fim, obteve-se o peptídeo contendo D-amino ácidos (NB2080). Inicialmente, foi realizado um screening com todos os peptídeos em células Vero infectadas com SARS-CoV-2. Os peptídeos MR1903, PE1940, MC1937, MC1947 e NB2080 apresentaram atividade anti-SARS-CoV-2 e foram investigados quanto ao seus mecanismos de ação, e atividade contra duas variantes (Omicron e Delta) desse vírus. Resultados demonstraram que a dimerização está relacionada com a atividade contra esse vírus. O peptídeo tetrâmero (PE1940) apresentou atividade nos estágios de entrada e pós-entrada do ciclo de replicação do SARS-CoV-2, e o dímero (MR1903), demonstrou efeito profilático e em etapas após a entrada. Já os peptídeos MC1937 e MC1947, característicos pela adição de peptídeos de penetração celular, resultaram em inibição de todas as etapas testadas do ciclo replicativo (entrada, pré tratamento, virucida e pós-entrada) do SARS-CoV-2. Por fim, o peptídeo D-amino ácido (NB2080) possui um mecanismo de ação muito semelhante a MR1903 usado nesse trabalho, porém não apresentou efeito contra as variantes testadas desse vírus.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2. Antiviral. Peptídeos. Mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for causing Covid-19, and the first patients diagnosed with this disease were reported in China, in December of 2019. In March of 2020, because of the high number of infected in the whole world, the World health organization declared it was a pandemic case. Even though, there is a vaccine approved for this virus, there is still the needed to develop a treatment for grave and immunosuppressed patients. In reason of the great world health problem that SARS-CoV-2 still represents, along with the potential of studies using antiviral peptides, the aim of this work was to identify and investigate the potential of peptides against SARS-CoV-2 infection. For that purpose, three questions were elaborated in relation to a main peptide (MR1903): 1) How can dimerization be related to anti-SARS-CoV-2 action? To answer that, three other peptides were elaborated, with different pattern of dimerization (PE1940, MR2024, EMC2109); 2) Can the addition of cell-penetrating peptide to the structure result in an enhance of antiviral activity against SARS-CoV-2? Other three peptide were developed for this question (MC1937 e MC1947); 3) Peptide dextrorotation can be related to similar or high activity against SARS-CoV-2? And for that, one peptide with D-amino acids was elaborated (NB2080). Initially, it was performed a screening with all peptides using Vero infected with SARS-CoV-2. Peptides MR1903, PE1940, MC1937, MC1947 e NB2080 showed anti-SARS-CoV-2 activity, and they were investigated for their mechanism of action and effect against two variants (Omicron and Delta) of this virus. Results showed that dimerization is related to action against this virus. The tetrameric peptide (PE1940) has activity on entry and post-entry of the replication cycle of SARS-CoV-2, and the dimeric (MR1903) showed a prophylactic effect and action on steps after virus entering cells. Furthermore, peptides MC1937 and MC1947, with characteristics of cell penetrating peptides addition, resulted in inhibition of all steps of the replication cycle (entry, pretreatment, virucidal, and post-entry) of SARS-CoV-2. Finally, the D-amino acid peptide (NB2080) has a mechanism of action very similar to MR1903 used in the present work, however it did not present action against the variants tested.

**Key-words:** SARS-CoV-2. Antiviral. Peptides. Mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I – considerações gerais

<b>Figura 1</b> - Origem dos coronavírus causadores de doenças humanas. ....	25
<b>Figura 2</b> - a: Linha do tempo da pandemia causada pela COVID-19 da indicação dos primeiros casos e metade do ano de 2020. b: Distribuição global e a incidência de casos de COVID-19. ....	26
<b>Figura 3</b> - Modos zoonóticos de transmissão do SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19. ....	28
<b>Figura 4</b> -O vírus SARS-CoV-2 e suas principais proteínas estruturais.....	29
<b>Figura 5</b> -Genoma do SARS-CoV-2 19, com organização em ORFs individuais e a poliproteína 1ab (PP1ab), que incorpora as 16 proteínas não estruturais.....	31
<b>Figura 6</b> - Processo de infecção por SARS-CoV-2 em uma célula hospedeira.....	32
<b>Figura 7</b> - Alterações, que incluem substituições, deleções e inserções observadas nas variantes de preocupação identificadas. ....	35
<b>Figura 8</b> - Esquema resumido de estratégias de tratamento contra o SARS-CoV-2. ....	36

### Capítulo II – Manuscrito I

<b>Figure 1.</b> Results of the inhibition resulted from an initial antiviral screening for different dimerization patterns with the peptides .....	60
<b>Figure 2.</b> Results of antiviral initial assay showed peptides MR1903 and PE1940 with inhibition against SARS-CoV-2. ....	61
<b>Figure 3.</b> Analysis of cell viability and the dose dependence were performed using A549 cells for the peptides (A) MR1903 (B) PE1940.....	63
<b>Figure 4.</b> The entry step analysis of SARS-CoV-2 replication cycle.....	64
<b>Figure 5.</b> The virucidal effect against SARS-CoV-2.....	66
<b>Figure 6.</b> Protective effect of the peptides against SARS-CoV-2 infection .....	67
<b>Figure 7.</b> Effects of the peptide PE1940 on SARS-CoV-2 attachment and internalization on A549 cells.....	68
<b>Figure 8.</b> Effect of the peptides on the post-entry steps of SARS-CoV-2 infection.....	70

<b>Figure 9.</b> Double strand RNA in vitro analysis was performed by incubating the peptides with synthesised dsRNA as described in our methodology section. ....	71
<b>Figure 10.</b> General antiviral assay using A549 cells infected with Omicron (BA2) and Delta variants of SARS-CoV-2.....	73
<b>Figura 11.</b> Analysis of time-addition experiments with A549 cells infected with a recombinant infection clone with replaced S-protein from Omicron.....	74
<b>Figure 12.</b> Analysis of time-addition experiments with A549 cells infected with a recombinant infection clone with replaced S-protein from Delta .....	75
<b>Figure 13.</b> Results from six passages for drug resistance assay using A549 cells infected with Wild-type SARS-CoV-2.....	78
Material Suplementar:	
<b>FS1.</b> Primers designed for the double strand RNA experiment performed.....	83
<b>Fig S2.</b> Cell viability results after treating Vero, BHK-21, and A549 cells for 24 hours with the peptides (A) MR1903, (B) PE1940, (C) MR2024, and (D) EMC2109 .....	83
<b>Fig S3.</b> Subgenomic replicon backbone construction .....	84
<b>Fig.S4.</b> The replication effect caused by the peptides was tested using a subgenomic replicon for SARS-CoV-2 .....	85
<b>Fig.S5.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptide PE1940 .....	86
<b>Fig.S6.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptide PE1940 .....	86
<b>Fig.S7.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptide MR1903.....	86
<b>Fig.S8.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptide MR1903.....	86

**Capítulo III – Manuscrito II**

<b>Figure 1.</b> Results of the inhibition resulted from an initial antiviral screening for two different peptides with cell-penetrating characteristics added to their structure .....	105
<b>Figure 2.</b> Results of antiviral initial assay showed peptides MR1903 and PE1940 with inhibition against SARS-CoV-2, so they were taken for a time addition analysis to test for (A) Entry step inhibition, (B) Post-entry effects, and (C) Virucidal effect for MC1937 and MC1947 using Vero cells .....	106
<b>Figure 3.</b> Analysis peptides' dose dependence was performed using A549 cells for the peptides (A) MC1937 (B) MC1947 .....	110
<b>Figure 4.</b> Results from experiment that analyze the potential of associated treatment with the peptides.....	110
<b>Figure 5.</b> The effect of the peptides in entry step of SARS-CoV-2 replication cycle	111
<b>Figure 6.</b> The virucidal effect of the peptides against SARS-CoV-2-mCherry .....	112
<b>Figure 7.</b> The pre-treatment effect of the peptides against SARS-CoV-2-mCherry.....	113
<b>Figure 8.</b> The effect of the peptides in the attachment step of the SARS-CoV-2-mCherry in A549 cells .....	114
<b>Figure 9.</b> To better understand the specific effect of both peptides resulting from the entry step, the internalization analysis was performed.....	116
<b>Figure 10.</b> Results from experiment to analyze peptides effect on steps post-entry .....	117
<b>Figure 11.</b> Results from a treatment of the peptides in the double strand RNA <i>in vitro</i> .....	119
<b>Figure 12.</b> Results from a general effect experiment to test the action of the peptides against two SARS-CoV-2 variants .....	120
<b>Figure 13.</b> Results from experiments of action of peptides in the replication cycle, using A549 cells infected with a recombinant infection clone with replaced S-protein from Omicron	122
<b>Figure 14.</b> Results from experiments of action of peptides in the replication cycle, using A549 cells infected with a recombinant infection clone with replaced S-protein from Delta .....	123
<b>Figure 15.</b> Results from seven passages after drug resistance of the peptides using A549 cells infected with Wild-type SARS-CoV-2 .....	126

Material Suplementar:

<b>FS1.</b> Primers designed for the double strand RNA experiment performed.....	150
<b>FS2.</b> Cell viability of Vero, BHK-21, and A549 after treatment with peptides <b>(A)</b> MC1937 and <b>(B)</b> MC1947 for 24 hours .....	150.
<b>Fig S3.</b> Results from the replication effect caused by both peptides, using the subgenomic replicon for SARS-CoV-2 .....	150
<b>Fig.S4.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptides MC1937 and MC1947 .....	132
<b>Fig.S5.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptides MC1937 and MC1947 .....	132
<b>Fig.S6.</b> Alignment of sequencing results from SARS-CoV-2 initial passage, after passages, and after treatment with peptides MC1937 and MC1947 .....	132

#### **Capítulo IV – Manuscrito III**

<b>Figure 1.</b> <b>(A)</b> Results from dose dependence of dextrogyre of dimeric peptide .....	147
<b>Figure 2.</b> Results from entry step effect of dextrogyre dimeric peptide experiments for two times post infection .....	147
<b>Figure 3.</b> Results of protective action of the peptide NB2080 after twelve and twenty-four hours post infection .....	148
<b>Figure 4.</b> Results of virucidal effect of the peptide NB2080 after twelve and twenty-four hours post infection .....	149
<b>Figure 5.</b> Results of post-entry action of the peptide NB2080 after twelve and twenty-four hours post infection .....	150
<b>Figure 6.</b> Double strand RNA in vitro analysis was performed incubating a synthetic double strand RNA with peptide NB2080.....	151
<b>Figure 7.</b> Results of potential of the peptide NB2080 against the variants Omicron and Delta of SARS-CoV-2.....	152

Material Suplementar:

<b>Supplementary Figure 1.</b> Primers designed for the double strand RNA experiment performed.....	155
---	-----

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

**(pBthTX-I)2K** - peptídeo (KKYRYHLKPF)2K

**3Clpro** - Protease semelhante à quimiotipsina, do inglês 3C-like protease

**ACE2** - enzima conversora de angiotensina 2, do inglês Angiotensin-converting enzyme 2

**BSL-3** - Sala de biossegurança de nível 3, do inglês Biosafety Level 3

**cDNA** - DNA complementar

**CoVs** – Coronavírus

**CC50** – Concentração de citotoxicidade 50%, do Inglês 50% Cytotoxic concentration

**DMEM** - Meio Dulbecco MEM

**DMSO** - Dimeltisulfóxido

**ECMO** - Oxigenação por membrana extracorpórea, do inglês Extracorporeal membrane oxygenation

**FDA** - do inglês Food and Drug Administration

**HCoV-NL63** - Coronavírus humano NL63

**HCoV-229E** - Coronavírus humano 229E

**HCoV-OC43** - Coronavírus humano OC43

**HCV** - Vírus da hepatite C, do inglês Hepatite C vírus

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humano, do inglês Human immunodeficiency vírus

**HKU1** - Coronavírus humano HKU1

**ICTV** - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

**IC50** – Concentração de inibição 50%, do Inglês Half-maximal inhibitory concentration

**SI** – Índice de seletividade, do Inglês Selective index

**MEM** - Meio essencial mínimo

**MERS** - Síndrome respiratória do Oriente Médio

**MOI** - multiplicidade de infecção, do inglês multiplicity of infection

**Mpro** - Principal protease do SARS-CoV-2, do inglês Main protease  
MTT: (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

**nsPs** - Proteínas não estruturais, do inglês non structural proteins

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**ORFs** - quadros de leitura aberta, do inglês Open Reading Frames

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction

**PFU** - Unidades formadoras de placa por mL, do inglês plaque forming unit

**Ppro** - Protease semelhante à papaína, do inglês Papain-like protease

**PPCs** - Peptídeos de penetração celular

**RaTG13** - Betacoronavirus

**RE** - Retículo endoplasmático

**RNA** - Ácido ribonucleico, do inglês Ribonucleic acid

**RTC** - Complexo replicase-transcriptase, do inglês Replicase Transcription Complex

**RdRp** - Polimerase dependente de RNA, do inglês RNA-dependent RNA polymerase

**SARS** - Síndrome respiratória aguda grave

**SFB** - Soro Fetal Bovino

**TMPRSS2** - Serino-protease transmembranica 2, do inglês Transmembrane protease, serine 2

**VOCs** - Variantes de preocupação

**VOIs** - Variantes de interesse

**VUMs** - Variantes sob monitoramento

**ZIKV** - Zika vírus

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>22</b>
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>22</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. Coronavírus.....	23
1.2. COVID-19.....	25
1.3. SARS-CoV-2.....	29
1.4. Prevenção e tratamentos disponíveis.....	35
1.5. A ampla possibilidade de estudo envolvendo peptídeos como antivirais.....	39
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1. Objetivo geral.....	41
2.2. Objetivos específicos.....	41
<b>CAPÍTULO II – Artigos científicos.....</b>	<b>50</b>
<b>Manuscrito I.....</b>	<b>50</b>
1. Introduction.....	52
2. Material and Methods.....	53
2.1. Peptides.....	53
2.2. Cells.....	54
2.3. Virus.....	54
2.4. Evaluation of the Cytotoxicity Profile of the Peptides.....	55
2.5. Anti-SARS-CoV-2 primary screening of the peptides.....	55
2.5.1. Initial analysis of peptides potential on SARS-CoV-2 replication cycle.....	55
2.5.2. Analysis by real time qPCR.....	56
2.6. Antiviral activity of the peptides in human lung cells.....	56
2.6.1. Dose dependence analysis.....	56
2.6.2. Analysis of peptides action on entry step.....	56
2.6.3. Analysis of peptide on the SARS-CoV-2 attachment to the cells.....	57
2.6.4. Analysis of peptide on the SARS-CoV-2 internalization.....	57
2.6.5. Virucidal effect of peptides.....	57
2.6.6. Protective effect of peptides against SARS-CoV-2 infection.....	58
2.6.7. Study of the peptides action on the post-entry of SARS-CoV-2 in cells.....	58
2.6.8. Evaluation of activity of the peptides against SARS-CoV-2 variants: Omicron (BA2) and Delta.....	58

2.6.9. Analysis of peptides action on the replication cycle of the Omicron and Delta variants.....	58
2.7. Investigation of peptides action on replication step .....	59
2.8. Evaluation of <i>in vitro</i> inhibition of SARS-CoV-2 synthetic double strand RNA by peptides .....	59
2.9. Analysis of SARS-CoV-2 resistance to treatment with the peptides .....	59
2.10. Sequencing .....	60
2.11. Statical analysis .....	60
3. Results.....	60
3.1. Maximum non-toxic peptides concentrations selection for antiviral assays using Vero, BHK-21, and A549 cell lines .....	60
3.2. Screening shows that dimerization is related to anti-SARS-CoV-2 action .....	60
3.2.1. Peptides have potential effect on SARS-CoV-2 replication cycle .....	61
3.3. Peptides show potential antiviral effect on several steps of replication cycle in lung human cells infected with SARS-CoV-2 .....	63
3.3.2. Tetrameric peptide shows effect on entry step .....	64
3.3.3. Peptides do not show potential in virus particle incubation prior infection....	66
3.3.4. MR1903 causes protective effect on A549 cells.....	67
3.3.5. Further investigation of PE1940 in the entry step of the SARS-CoV-2 replication cycle .....	68
3.3.6. Peptides have high antiviral potential on post-entry step.....	70
3.3.7. Peptides can inhibit double strand RNA in vitro .....	71
3.3.8. Peptides can also inhibit the infection with the variants omicron (BA2) and delta	72
3.3.9. Peptides effects on steps of Omicron variant replication cycle .....	74
3.3.10. Peptides effects on steps of delta variant replication cycle.....	75
3.3.11. SARS-CoV-2 shows adaptation to peptides treatment .....	77
4. Discussion .....	78
5. Conclusion .....	82
Supplementary material.....	83
References.....	87
CAPÍTULO III – Artigos científicos.....	95
Manuscrito II .....	95
1. Introduction.....	97
2. Material and methods.....	98
2.1. Peptides .....	98
2.2. Cells .....	98

2.3. Virus .....	99
2.4. Evaluation of the Cytotoxicity Profile of the Peptides .....	99
2.5. Initial screening for anti-SARS-CoV-2 action using Vero cells .....	100
2.5.2. Analysis by real time qPCR.....	100
2.7. Antiviral activity of the peptides in human lung cells.....	101
2.7.1. Dose dependence analysis .....	101
2.7.2. Associated treatment analysis .....	101
2.7.3. Analysis of peptides action on entry step .....	101
2.7.4. Analysis of peptides on the SARS-COV-2 attachment to the cells .....	102
2.7.5. Analysis of peptide on the SARS-CoV-2 internalization .....	102
2.7.6. Virucidal effect of peptides.....	102
2.7.7. Protective effect of peptides against SARS-CoV-2 infection .....	103
2.7.8. Study of the peptides action on the post-entry of SARS-CoV-2 in cells.....	103
2.7.9. Evaluation of activity of the peptides against SARS-CoV-2 variants: Omicron (BA2) and Delta .....	103
2.7.10. Analysis of peptides action on the replication cycle of the Omicron and Delta variants.....	103
2.8. Investigation of peptides action on replication step .....	104
2.9. Evaluation of <i>in vitro</i> inhibition of SARS-CoV-2 synthetic double strand RNA by peptides .....	104
2.10. Analysis of SARS-CoV-2 resistance to treatment with the peptides .....	104
2.11. Sequencing .....	105
2.11. Statical analysis .....	105
3. Results .....	105
3.1. Cytotoxicity profile of peptides .....	105
3.2. Initial screening for anti-SARS-CoV-2 action using Vero cells .....	105
3.2.1. Analysis of antiviral effect of peptides on replication cycle using Vero cells.	106
3.3. MC1937 and MC1947 show dose dependence effect against SARS-CoV-2 in A549 cells.....	108
3.4. Peptides potential against the virus is enhanced with associated treatment.....	110
3.5. MC1937 and MC1947 showed potential on entry step using infected A549 cells .....	110
3.6. Both peptides have action on viral particle of SARS-CoV-2.....	112
3.7. Peptides showed potent prophylactic effect in A549 cells.....	113
3.8. Peptides cause effect on attachment step of virus infection.....	114
3.9. Peptides also impair internalization of virus .....	116

3.10. Peptides also have action on post-entry steps of viral replication .....	117
3.11. MC1937 and MC1947 cause high inhibition in double strand RNA <i>in vitro</i> .	119
3.12. Cell penetrating peptides also showed action against SARS-CoV-2 variants	120
3.13. Cell penetrating peptides have effect in different steps of viral replication during SARS-CoV-2 Omicron variant infection .....	121
3.13. Cell penetrating peptides have effect in different steps of viral replication during Delta variant infection .....	123
3.14. Virus can achieve resistance to treatment with peptides after six passages ...	125
4. Discussion .....	126
5. Conclusion .....	129
Supplementary material .....	130
References .....	133
<b>CAPÍTULO IV – Artigos científicos .....</b>	<b>139</b>
<b>Manuscrito III.....</b>	<b>139</b>
1. Introduction.....	141
2. Material and methods.....	141
2.1. Peptide synthesis.....	141
2.2. Cells .....	142
2.3. Virus .....	142
2.4. Evaluation of the Cytotoxicity Profile of the Peptides .....	143
2.5. Dose dependence analysis .....	143
2.6. Analysis of peptides action on entry step .....	144
2.7. Analysis of peptide on the SARS-CoV-2 attachment to the cells .....	144
2.8. Analysis of peptide on the SARS-CoV-2 internalization .....	144
2.9. Virucidal effect of peptides.....	144
2.10. Protective effect of peptides against SARS-CoV-2 infection .....	145
2.11. Study of the peptides action on the post-entry of SARS-CoV-2 in cells.....	145
2.12. Evaluation of activity of the peptides against SARS-CoV-2 variants: Omicron (BA2) and Delta .....	145
2.13. Analysis of peptides action on the replication cycle of the Omicron and Delta variants.....	145
2.14. Evaluation of <i>in vitro</i> inhibition of SARS-CoV-2 synthetic double strand RNA by peptides .....	146
2.15. Statical analysis .....	146
3. Results .....	146
3.1. NB2080 can inhibit SARS-CoV-2 infection in a dose dependence manner .....	146

3.2. NB2080 was not able to inhibit the entry step .....	147
3.3. Peptide is responsible for causing a protective effect against SARS-CoV-2 infection .....	148
3.4. NB2080 did not impair virus particle .....	148
3.5. Peptide strongly impairs post-entry step of SARS-CoV-2 replication cycle.....	149
3.6. Peptide can inhibit double strand RNA of SARS-CoV-2 .....	150
3.7. Peptide does not show action against variants Omicron e Delta .....	151
4. Discussion .....	153
5. Conclusion .....	154
Supplementary material.....	155
References.....	156
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>160</b>
Conclusão .....	160
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>163</b>
Artigos publicados .....	163

**CAPÍTULO I –  
CONSIDERAÇÕES GERAIS**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são característicos por causar doenças associadas à problemas respiratórios e infecções intestinais em animais e no homem (CUI; LI; SHI, 2019a). Esse grupo está incluso na família Coronaviridae, composto por vírus de RNA envelopado, e que são capazes de infectar diversos hospedeiros, dentre estes aves, suínos e humanos (LIM et al., 2016). Porém, a maioria dos vírus pertencentes a esse grupo são os coronavírus causadores de doenças em humanos, como resfriados ou até broquite e pneumonia .(PENE et al., 2003).

As principais características dos coronavírus englobam sua morfologia, de maneira que estes são esféricos e apresentam cerca de 125 nm de diâmetro, e devido a aparência da superfície do vírus se assemelhar a uma coroa solar, resultou sua nomenclatura de coronavírus (BÁRCENA et al., 2009; MALIK, 2020; NEUMAN et al., 2006). No interior do envelope, o nucleocapsídeo se dispõem em forma de hélice simetricamente, característica inclusive que não é comum entre os vírus que possuem RNA de sentido positivo (MALIK, 2020).

Somente após o surto de 2002 e 2003, causado pela síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), que ocorreu na província de Guangdong, na China, esse grupo foi considerado como de elevada patogenicidade para os seres humanos, pois, anteriormente, os coronavírus que estavam em circulação só causavam infecções leves (CUI; LI; SHI, 2019b). Posteriormente, no ano de 2012, ocorreram relatos em países do Oriente Médio do surgimento do coronavírus causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que também demonstrou características patogênicas graves, como deficiência respiratória e insuficiência renal (CUI; LI; SHI, 2019b; ZAKI et al., 2012).

O SARS-CoV foi caracterizado como um vírus de alta infectividade, após uma notificação de um surto em um hospital em Hong Kong, em que 138 pessoas se infectaram após duas semanas de contato com um paciente positivo para o vírus (LEE et al., 2003). Até o controle da pandemia por esse vírus, que foi em julho de 2003, foram notificados relatos do SARS-CoV em 29 países e regiões, totalizando 8098 casos e 774 mortes (ZUMLA et al., 2016).

Até o início de outubro do ano de 2015, já haviam sido notificados à Organização Mundial da Saúde cerca de 1593 casos de pacientes infectados pelo vírus MERS-CoV, e desses casos 568 levaram a morte. O MERS-CoV possui um potencial pandêmico menor que o SARS-CoV, porém o MERS possui maior rapidez de desenvolvimento dos sintomas clínicos e maior

taxa de letalidade, fazendo com que esse vírus seja ainda considerado de alto risco (ZUMLA et al., 2016).

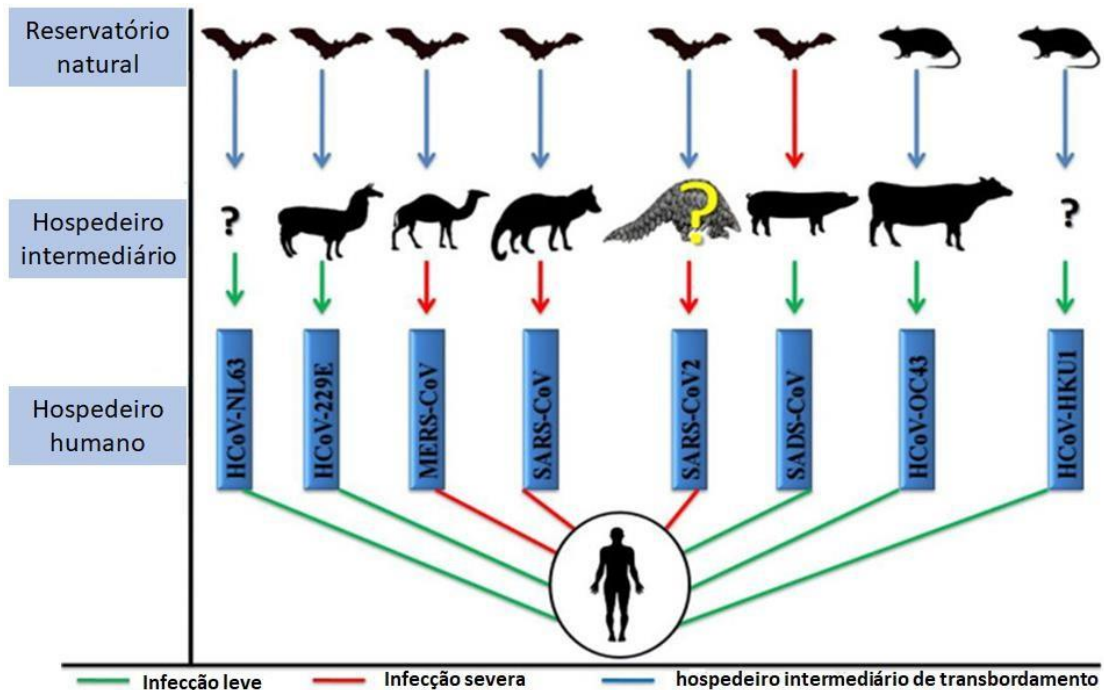
A transmissão desses vírus para os seres humanos ocorreu potencialmente por meio de camelos dromedários e civetas de mercado. Mas há ainda, estudos que apontam que a principal hipótese é da transmissão do vírus de morcegos para seres humanos, sendo assim, de origem zoonótica (CUI; LI; SHI, 2019a).

HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 e HKU1 são outros exemplos de coronavírus que causam doenças em humanos. Estes possuem como característica o desenvolvimento de doenças respiratórias superiores leves em hospedeiros que estão imunocompetentes. Além disso, esses coronavírus também podem causar infecções graves em bebês, crianças e idosos (CUI; LI; SHI, 2019a; FORNI et al., 2017; PENE et al., 2003).

Em relação à origem desses coronavírus (Figura 1), todos que são causadores de doenças humanas, possuem como origem os animais, e precisaram de um hospedeiro intermediário de transbordamento (JUNEJO et al., 2020). A origem dos coronavírus citados anteriormente SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63 e HCoV-229E são os morcegos, já HCoV-OC43 e HKU1 possuem como origem provável os roedores (CUI; LI; SHI, 2019b).

Ainda sobre a origem desse vírus, além de estudos demonstrarem semelhanças entre os genomas do SARS-CoV-2 e o coronavírus RaTG13 presente em morcego (CHEN; LIU; GUO, 2020a; GUO et al., 2020a; SINGHAL, 2020), ainda foram encontrados segmentos que consistem com relações filogenéticas de diferentes cepas de Sarbecovirus, em relação a proteína S do SARS-CoV-2 (SINGH; YI, 2021).

**Figura 1** - Origem dos coronavírus causadores de doenças humanas.



Fonte: Adaptado de (JUNEJO et al., 2020).

## 1.2. COVID-19

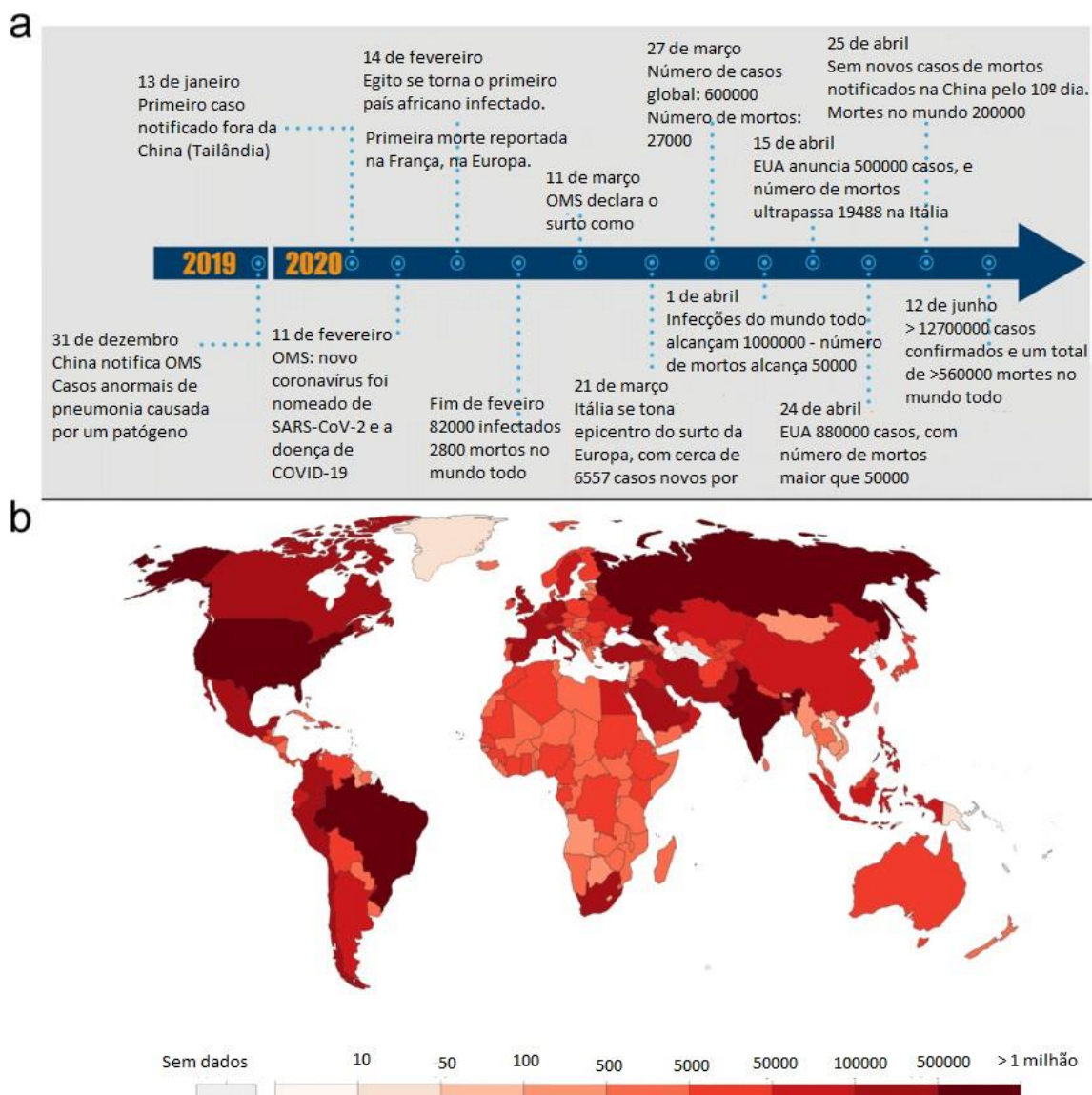
Em dezembro de 2019, diversos casos de problemas respiratórios de origem desconhecida foram notificados na província de Wuhan, na China. Relatos apontavam que os pacientes que apresentavam sintomas parecidos, semelhantes a uma pneumonia, teriam frequentado um mercado local da província, conhecido como Huanan Seafood Wholesale Market. Tal descoberta foi importante para rastrear e detectar a causa da doença nos infectados: o coronavírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2) (CIOTTI et al., 2019).

A identificação desse novo coronavírus ocorreu em 4 de janeiro pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e a nomeação como SARS-CoV-2 ocorreu em 11 de fevereiro pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), em razão da similaridade genética com o SARS-CoV (MACHHI et al., 2020). No final do mês de fevereiro de 2020, já haviam sido relatados 82.000 infecções e um número de mortes de 2.800 por todo o mundo. Diante a isso, a OMS declarou, no dia 11 de março, um surto de pandemia, fazendo com que houvesse a implementação de medidas pelo mundo todo, buscando maneiras de “achatar a curva” de infecção, e assim tentando desacelerar a disseminação do vírus (MACHHI et al., 2020).

Porém, no final do mês de março, enquanto a Itália se tornou um epicentro, em decorrência do rápido avanço no número de casos, os EUA notificou pelo menos 100.000 casos

e cerca de 2.700 mortes, e o número de casos no mundo alcançou mais de 600.000, com cerca de 29.000 mortes (Figura 2a). No início de abril, alcançou-se a marca de 1 milhão de infectados e 50.000 mortes. Apenas em meados do fim do mês de abril, que se observou uma diminuição nos casos de infectados para os primeiros países que notificaram situação mais alarmante no início da pandemia, como era o caso da Itália e China. Porém, nesse período foi contabilizado um total de 3 milhões de infectados pelo SARS-CoV-2 no mundo (Figura 2b) (MACHHI et al., 2020).

**Figura 2** - a: Linha do tempo da pandemia causada pela COVID-19 da indicação dos primeiros casos e metade do ano de 2020. b: Distribuição global e a incidência de casos de COVID-19.



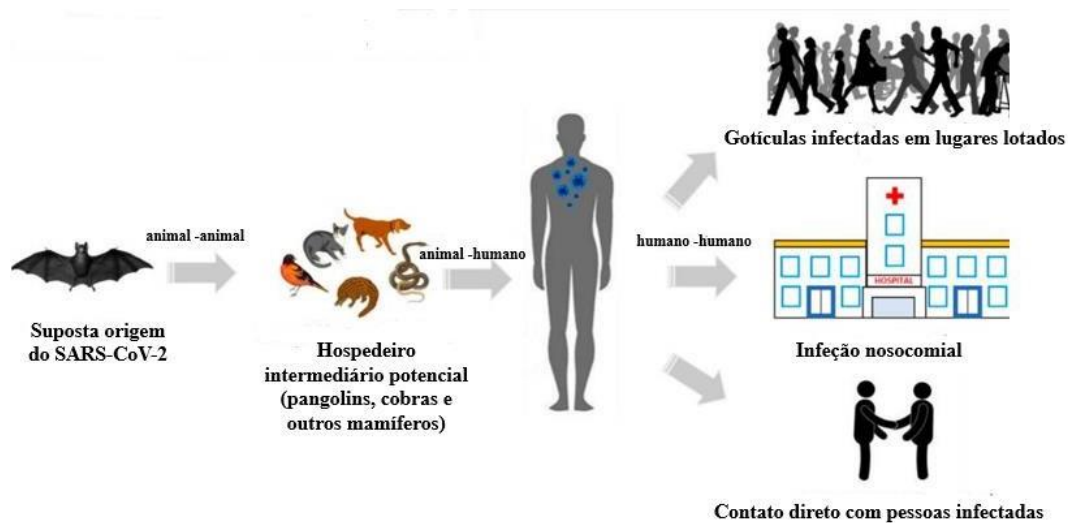
Fonte: Adaptado de (MACHHI et al., 2020).

A última coleta de dados para o número de infectados por SARS-CoV-2 foi realizado em 03 de outubro de 2023, pela Universidade John Hopkins, e o resultados mostraram até essa

data, um total de 676.609.955 de infectados no mundo todo, contando com 6.881.955 mortes (CENTER FOR SYSTEMS SCIENCE AND ENGINEERING (CSSE), 2023).

A transmissão do SARS-CoV-2 entre humanos ocorre principalmente através das gotículas salivares de pacientes infectados, e também é possível através do toque em superfícies contaminadas e depois no nariz, olhos e boca, denominada de transmissão de fômite, além da transmissão via oral-fecal (Figura 3) (CHEN et al., 2020; GUO et al., 2020b; SINGHAL, 2020). Também é conhecida a denominada infecção nosocomial, na qual ocorre a contaminação em quartos de hospital que abrigam pacientes positivos para o vírus. O estudo de Santarpia et al (2020) confirmou a presença do RNA viral do SARS-CoV-2 em itens de locais do hospital e das instalações sanitárias, assim como também em amostras de ar (Santarpia et al., 2020; Sharma et al., 2021). Em relação a transmissão vertical intrauterina, um estudo demonstrou testes negativos para recém-nascidos, em que as mães grávidas estavam positivas para o SARS-CoV-2, assim como também, análises do líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e leite materno demonstraram resultados negativo para o SARS-CoV-2 (SANTARPIA et al., 2020; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021). Porém, um estudo mais recente, demonstrou que há a possibilidade de 5,7% de transmissão vertical, baseado principalmente na transmissão placentária, mas o estudo enfatiza a importância de ainda serem realizados mais estudos clínicos (WANG; DONG, 2022). Ainda, também há evidências de detecção do RNA viral em amostras de tecido de placenta, o que corrobora para uma potencial transmissão vertical (DENIZ; TEZER, 2022).

**Figura 3** - Modos zoonóticos de transmissão do SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19.



Fonte: Adaptado (SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021).

A transmissão desse vírus pode iniciar de 1 a 2 dias antes da apresentação dos sintomas, sendo que nos estágios de início da infecção, o título viral apresenta maiores valores, e logo após isso, começa a decair (OCHANI et al., 2021). Os testes mais comumente utilizados para a confirmação do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 são: detecção de anticorpos humanos, antígenos virais e genes virais, sendo este último, considerado a técnica com resultados de maior confiabilidade (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021). Porém, existem outros métodos de identificação do vírus, como testes baseados em CRISPR, que é uma técnica mais sensível, sequenciamento, tomografia computacional por raio-x, e biosensores (RONG et al., 2023).

A detecção de genes virais é realizada por meio do PCR em tempo real, utilizando uma amostra de swab nasal ou garganta (CHEN; LIU; GUO, 2020b). Ainda, já foi comprovado na literatura ser possível a detecção do SARS-CoV-2 utilizando amostras de saliva, sendo um método menos invasivo para a testagem de pacientes (TAKEUCHI et al., 2020).

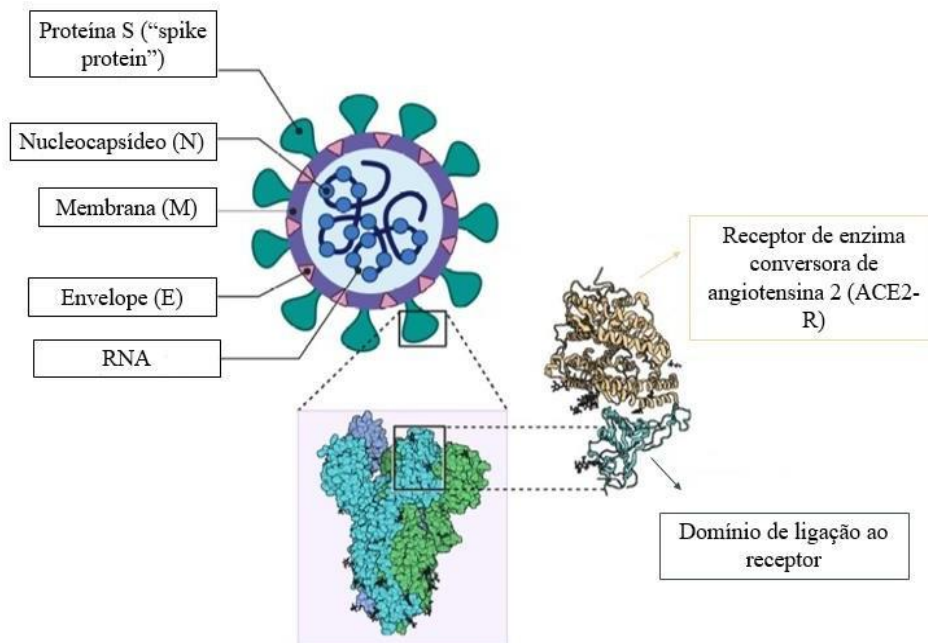
Os sintomas mais comuns apresentados por pacientes envolvem: febre, dores no corpo e musculares, cansaço, nariz congestionado e com corrimento, tosse seca, dor de garganta, e alguns pacientes apresentaram perda do apetite. Outros sintomas que também já foram relatados incluem: náuseas e vômitos, produção de escarro, dor de cabeça, arrepios, dispneia, dores no peito, e até mesmo expectoração de sangue (MADABHAVI; SARKAR; KADAKOL, 2020). Ainda, foi descrito em estudos, que pacientes que desenvolveram síndrome de desconforto

respiratório agudo podem levar a um quadro de piora acelerada, vindo a óbito por falência de múltiplos órgãos (SINGHAL, 2020; WANG; DONG, 2022). Além disso, existem casos de pacientes assintomáticos, que estão infectados porém não apresentam nenhum sintoma durante todo o período de incubação do vírus (OCHANI et al., 2021).

### 1.3. SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 é envelopado, possui um RNA de fita simples e senso positivo. Dentre os vírus de RNA, os coronavírus possuem os maiores genomas, com 27 a 32 kb (RAVI; SAXENA; PANDA, 2022a). O nucleocapsídeo protege o genoma viral dos coronavírus, sendo que, esse nucleocapsídeo possui como característica um formato helicoidal, quando relaxado, e quando dentro do vírus possui um formato esférico (Figura 4). Os coronavírus fazem parte de uma família da ordem Nidovirales, que possui vírus com característica de utilizar um conjunto de mRNA durante seu processo replicação (LAUXMANN; SANTUCCI; AUTRÁN-GÓMEZ, 2020a; YAO et al., 2020).

**Figura 4** -O vírus SARS-CoV-2 e suas principais proteínas estruturais.



Fonte: Adaptado de (CASCELLA et al., 2024).

O genoma do SARS-CoV-2 contém seis quadros de leitura aberta de codificação (ORFs) (Figura 5). A ORF1a/b que representa aproximadamente um terço de todo o genoma e está em 5', é responsável por codificar as proteínas não estruturais (nsp) (poliproteína 1a,b (pp1ab)) (RAVI; SAXENA; PANDA, 2022b). Sendo a poliproteína 1a correspondente as proteínas nsp1

a nsp11, e a poliproteína 1ab correspondente as proteínas nsp11 a nsp16. Já as ORFs localizadas na região 3', codificam as proteínas estruturais: proteínas S (“spike protein”), de membrana (M), de envelope (E) e nucleocapsídeo (N) (CHEN; LIU; GUO, 2020a; DU et al., 2009; RAVI; SAXENA; PANDA, 2022b; TU et al., 2020a). Além de também possuir proteínas acessórias que são codificadas por ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b e ORF8 (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

A proteína M tem papel principalmente na montagem de novas partículas virais, em que fatores do hospedeiro se juntam aos do vírus e tem-se a formação dessas novas partículas. Já a proteína E tem função de canal iônico, sendo importante desde a montagem da partícula viral até sua liberação. A proteína N é importante para a patogênese viral, coopera com a proteína M, de maneira a transcrição e a montagem do vírus ocorrerem mais eficientemente (KAUL et al., 2021a).

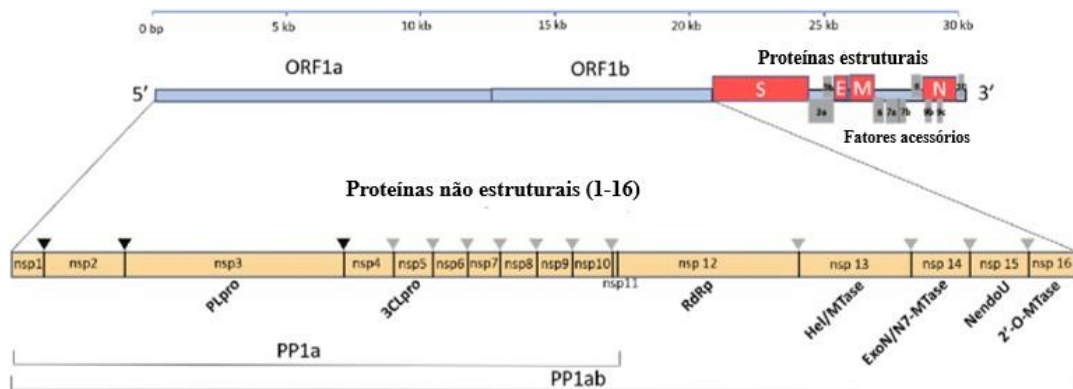
A proteína estrutural S é a responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, mediando então a entrada do vírus na célula, sendo essa proteína reconhecida pelo receptor da célula, que é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). A proteína S possui um domínio de ligação ao receptor (RBD), um domínio de fusão e um domínio transmembranar (ZHANG et al., 2021). O RBD da proteína S se liga à ACE2 para que então se inicie a entrada celular. A ligação da proteína S à ACE2 resulta em uma exposição dos locais de clivagem a proteases celulares. A clivagem da proteína S pela serino-protease transmembranica 2 (TMPRSS2) e outras proteases celulares inicia o processo de fusão e a endocitose. Dessa maneira, a entrada desse vírus na célula envolve a ligação ao receptor, o processamento proteolítico dessa proteína S, que leva então a fusão célula-vírus (PILLAY, 2020).

Estudos demonstraram que a entrada do SARS-CoV-2 na célula ocorre pela sequência de dois processos de clivagem da proteína S. Primeiramente, a ligação do vírus na ACE2 leva a modificações conformacionais na subunidade S1, expondo o sítio de clivagem na subunidade S2. O sítio S2' (interno a subunidade S2) é clivado por diversas proteases, sendo que a ativação das mesmas dependerá da maneira que o SARS-CoV-2 entra na célula, ou seja, a rota utilizada por esse vírus. A primeira rota está relacionada com a célula hospedeira não expressar TMPRSS2 suficiente ou se o complexo formado por vírus-ACE2 não encontrar TMPRSS2, de maneira que esse complexo será internalizado por via endocitose mediada por clatrina nos endolisossomos, e a clivagem do sítio S2' é feito pelas catepsinas, que necessitam de um ambiente ácido para seu funcionamento. Já na outra rota utilizada, a serino-protease transmembranica 2 (TMPRSS2) está presente, e então a clivagem de S2' ocorre na superfície

da célula. Independente da via, essa clivagem de S2' deixa o peptídeo de fusão exposto, além da dissociação de S1 de S2 acarretar mudanças conformacionais na subunidade S2, o que estimula o peptídeo de fusão para dentro da membrana da célula do hospedeiro. A partir dessa fusão entre a membrana do vírus e da célula, ocorre a formação de um poro, no qual o RNA é liberado no citoplasma para ocorrer as próximas etapas do ciclo de replicação do vírus SARS-CoV-2 (JACKSON et al., 2022; ZHANG et al., 2021)

Apesar de ACE2 ser o principal receptor utilizado por esse vírus para entrar nas células, outros estudos já relataram que outros possíveis receptores utilizados, como o estudo de Liu et al (2022), que utilizou um pseudovírus, analisou uma via alternativa de entrada do SARS-CoV-2. Os autores demonstraram que esse vírus também possui afinidade pela a integrina  $\alpha 5\beta 1$ , interagindo com o domínio extracelular dessa integrina, e desse modo, a internalização desse vírus também seria possível por outra via, que não seja utilizando o ACE2 .(LIU et al., 2022).

**Figura 5** -Genoma do SARS-CoV-2 19, com organização em ORFs individuais e a poliproteína 1ab (PP1ab), que incorpora as 16 proteínas não estruturais.



Fonte: Adaptado de (ROMANO et al., 2020).

O processo de infecção por SARS-CoV-2, de maneira geral, envolve as etapas de ligação, entrada, indução de proteínas replicase, replicação, transcrição, montagem das partículas virais e, por fim, a liberação dessas partículas (Figura 6). Mais detalhadamente, o vírus se liga à célula hospedeira e libera seu material genético no citosol, a partir disso então, ocorre a tradução do RNA em duas poliproteínas (pp1a e pp1ab, mencionadas anteriormente). Essas poliproteínas são então clivadas pelas proteases de cisteína, protease semelhante à papaína (PLpro) e a protease semelhante à quimiotipsina (3CLpro), de maneira a gerar as proteínas não estruturais (nsPs), e dessas uma parte irá se juntar para a formação do complexo replicase-transcriptase (RTC). As nsPs são importantes no direcionamento da síntese e



responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e essa diferença está relacionada com o maior potencial de disseminação do SARS-CoV-2 (LIU et al., 2020). Em razão disso, é importante ressaltar que, a proteína S se destaca como um alvo terapêutico (TU et al., 2020b; WALLS et al., 2020). A proteína S (“spike protein) possui como composição três unidades:

S1/S2 e o RBD, localizado em S1, e análises filogenéticas identificaram que a diferença entre o coronavírus SARS-CoV-2 e outros coronavírus relacionados ao SARS estaria em um local de reconhecimento de furina “RRAR” em S1 / S2. O SARS-CoV possui apenas uma arginina nesse local. Devido então à ligação mais forte formada pelo complexo ACE2-SARS-CoV-2, esse vírus se espalha de maneira mais rápida e estudos demonstraram a maior afinidade de ligação desse complexo quando comparado à ACE2-SARS-CoV (BAI; WARSHEL, 2020; XIA et al., 2020).

A linhagem original do SARS-COV-2, como outros vírus de RNA, passou por diversos processos evolutivos, de maneira a surgirem assim, diversas variantes desse vírus, que foram identificadas durante sequenciamentos genômicos periódicos. Dentre as variantes que surgiram, a OMS separou essas variantes em variantes de preocupação (VOCs), variantes de interesse (VOIs) e variantes sob monitoramento (VUMs) (CASCELLA et al., 2024; HE et al., 2021).

As variantes de preocupação possuem como algumas de suas principais características um maior potencial de transmissibilidade e também de virulência em relação à cepa original do SARS-CoV-2. Além disso, estudos demonstraram que possuem menor neutralização por anticorpos por infecção ou vacinação. Nessa categoria foram enquadradas 5 variantes : Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529) (ALEEM; AKBAR SAMAD; VAQAR, 2024; CASCELLA et al., 2024). Já as variantes de interesse são aquelas que possuem alterações genéticas previstas por afetar as propriedades do vírus relacionadas com sua transmissibilidade, o desenvolvimento da doença, e escapes diagnóstico e imunológico, e as variantes que entraram nessa categoria são: Epsilon (B.1.427 e B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) e Mu (B.1.621), segundo a Organização Mundial da Saúde. As variantes sob monitoramento são as que apresentam suspeita de causar alterar as características do vírus, mas ainda não há evidência bem esclarecida sobre seu impacto fenotípico ou epidemiológico (CASCELLA et al., 2024; CHOI; SMITH, 2021; HE et al., 2021).

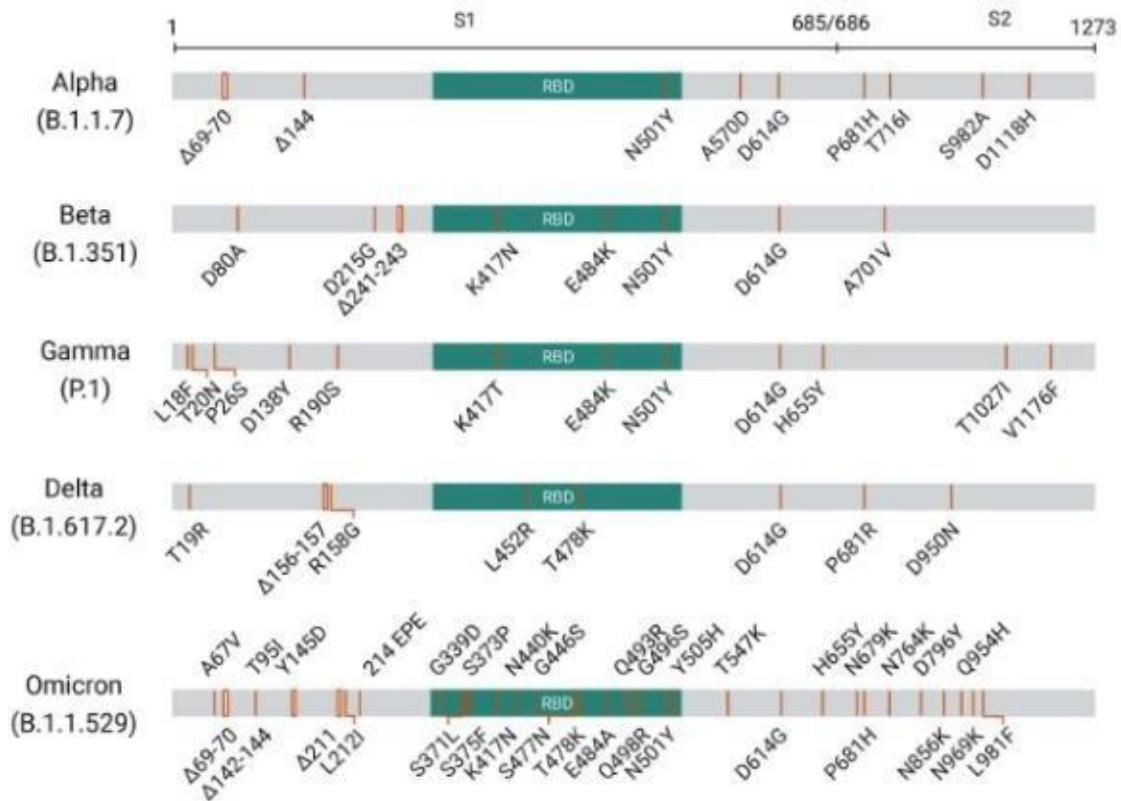
Dentre as variantes de preocupação, tem-se a variante Delta (B.1.617.2), que foi identificada pela primeira vez no final de 2020, em Maharashtra na Índia (MLCOCHOVA et

al., 2021). Essa variante prevaleceu no mundo entre o período de dezembro de 2020 a outubro de 2021, em razão de sua alta taxa de transmissão, sendo duas vezes maior que a da cepa original de Wuhan e 40-60% maior que da variante Alpha (BHATTACHARYA et al., 2023). Dentre suas características identificadas, sua proteína S (spike) se dispõem de maneira predominantemente clivada, em comparação com a variante Alpha, resultando em um aumento na eficiência de replicação nos sistemas organóides de vias aéreas e também em sistemas epiteliais das vias aéreas humana. Além disso, em comparação com a linhagem do tipo selvagem, a proteína S também demonstrou capacidade em formar um sincício de alta eficiência menos sensível a inibição por anticorpos neutralizantes (MLCOCHOVA et al., 2021).

Após o período de prevalência da variante Delta, foi a variante Ômicron que demonstrou dominância global (BHATTACHARYA et al., 2023). Identificada de uma amostra coletada em 9 de novembro de 2021 e relatada à OMS em 24 de novembro do mesmo ano. Após dois dias deste relato, a OMS já classificou essa variante como de preocupação. Essa variante se espalhou por diversos países de maneira muito rápida, o que já a caracterizou como um grande problema de saúde pública (HE et al., 2021). Com mais de 60 substituições/exclusões/inserções, essa é a variante que contém o maior número de locais de mutação de todas as variantes (HE et al., 2021). Ainda, esta é classificada em cinco linhagens (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5) e ainda em cinco sublinhagens (BA.1.1, BA.2.12.1, BA.2.11, BA.2.75, BA.4.6), e todas são caracterizadas pela alta taxa de mutação na proteína S (ZHOU; ZHI; TENG, 2023). Dentre suas principais características, é possível observar que esse grande número de mutações na proteína S (spike) demonstra uma potencialidade de aumento de transmissibilidade, resistência a terapias, e ainda, o escape parcial de imunidade induzida por vacina ou por infecção. A sua proteína S possui um grande número de alterações no domínio de ligação ao receptor e no domínio N-terminal, que são os alvos primários dos anticorpos neutralizantes (“SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant — United States, December 1–8, 2021”, 2021; SCHMIDT et al., 2022).

Como dito ao longo do texto, todas essas variantes possuem alterações na proteína S, que incluem substituições, deleções e inserções, e essas modificações podem ser observadas no quadro abaixo (Figura 7).

**Figura 7** - Alterações, que incluem substituições, deleções e inserções observadas nas variantes de preocupação identificadas.



Fonte: (HE et al., 2021).

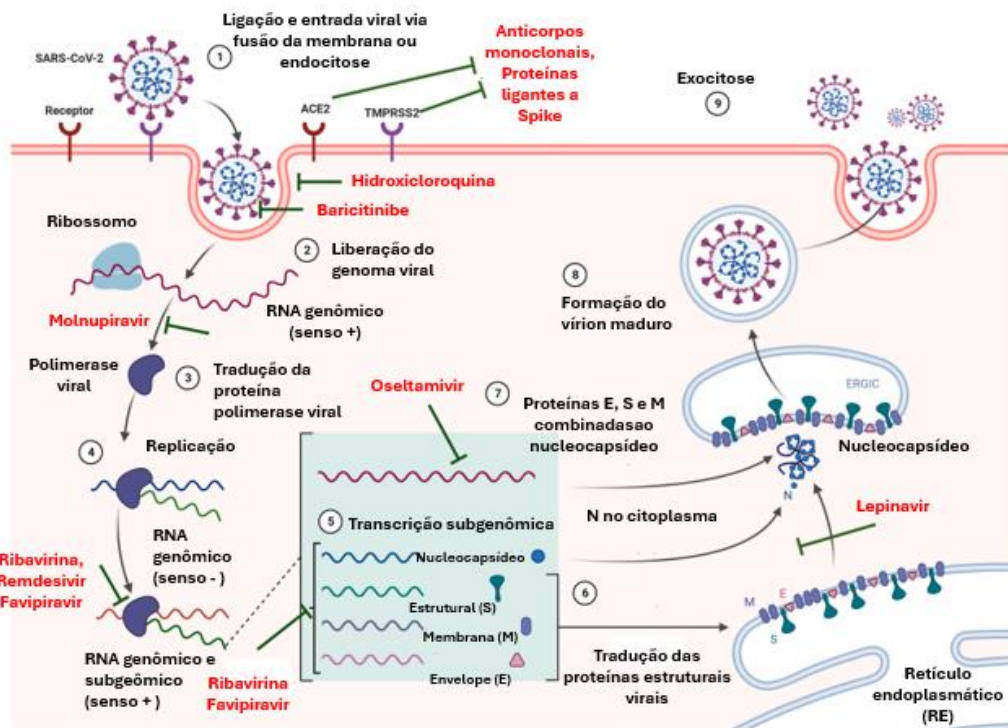
#### 1.4. Prevenção e tratamentos disponíveis

Desde o início da pandemia de COVID-19, a comunidade científica reuniu esforços para a busca de alternativas para diminuir os casos de pacientes positivos para o vírus, além de também diminuir a gravidade da doença causada pelo SARS-CoV-2. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, sendo a última atualização até o ano de 2023, existem 183 vacinas em etapa de desenvolvimento clínico, e 199 vacinas em desenvolvimento pré-clínico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Diferentes tecnologias foram utilizadas para o desenvolvimento de vacinas para a COVID-19, dentre elas, tem-se o vírion inteiro inativado, o vírus atenuado vivo, de ácido nucleico, proteína S recombinante e vetores do vírus (TO et al., 2021). Após a autorização de diversas vacinas pelo mundo todo e o início das campanhas de vacinação, obteve-se como resultado uma diminuição dos sintomas e dos casos severos da doença (LOPEZ BERNAL et al., 2021).

Em relação ao tratamento da doença, a maior parte dos pacientes que apresentam sintomas leves recebem tratamento sintomático, realizam o isolamento domiciliar e o

monitoramento da doença. Em casos de pacientes que já tenham problemas respiratórios, é indicado o fornecimento de oxigênio, através do uso de respiradores. A grande maioria dos pacientes aceitam oxigenoterapia, porém foi recomendada pela OMS a necessidade de oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) a pacientes com hipoxemia refratária (GUO et al., 2020b; SINGHAL, 2020). Além disso, existem diversas estratégias sendotestadas contra o SARS-CoV-2, e dentre essas, o uso de antimicrobianos e imunoterapia (ZOU et al., 2021a) (Figura 8).

**Figure 8** – Principais alvos antivirais testados contra o SARS-CoV-2



Fonte: (Hillary & Ceasar, 2023)

O uso de antimicrobianos engloba os antivirais, antimaláricos, antibióticos e antiparasitários. Devido à similaridade em 80-90% da sequência genômica e de diversas enzimas existentes entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus MERS e SARS, diversos compostos já testecontra MERS e SARS para a análise *in vitro* de possíveis ações contra o SARS-CoV-2 (JAMSHAIID et al., 2020). Em razão disso, e de inibidores de proteases demonstrarem uma atividade de inibição contra vírus de RNA, foi realizado um estudo na China com lopinavir-ritonavir, um ensaio clínico aberto e randomizado (ChiCTR2000029539), porém não foi observada diferença de melhora entre tratamento com lopinavir-ritonavir e o tratamento padrão, para pacientes hospitalizados (CAO et al., 2020). Análogos estruturais de nucleosídeos, como Favipiravir, Remdesivir e Ribavirina, demonstraram

também uma atividade inibitória contra o SARS-CoV-2, em estudos *in vitro* (JAMSHOID et al., 2020).

Ainda são necessário mais estudos com Favipiravir para comprovar sua ação em ensaios clínicos. Já o composto Remdesivir está sendo estudado sobre sua ação conjunto com Baricitinibe, em ensaios clínicos de fase I (Hillary & Ceasar, 2023).

Além disso, também já existem estudos que demonstram a ação inibitória de compostos contra esse vírus, como um estudo que utilizou o antibiótico Ivermectina e demonstrou a ação antiviral na etapa de replicação desse vírus, sendo possível observar uma diminuição da carga viral nas células que receberam o tratamento com esse composto (CALY et al., 2020). É importante ressaltar que os pacientes infectados com SARS-CoV-2 que precisaram ser internados possuem risco de coinfeção por bactérias, representando cerca de 3,5% dos casos. Sendo o caso então de alguns estudos recomendarem o tratamento com antibióticos. Porém, esse tipo de intervenção deve ser analisada pelo médico responsável para cada paciente (ZOU et al., 2021b).

Outro estudo analisou o efeito inibitório do composto Atazanavir na etapa de replicação do vírus SARS-CoV-2, e ainda, nesse mesmo trabalho, os autores testaram a ação do composto Atazanavir em conjunto com o Ritonavir, e foi possível observar novamente a inibição dessa etapa do ciclo viral, de forma que, o estudo sugere esses compostos como candidatos para maiores estudos clínicos contra o SARS-CoV-2 (FINTELMAN-RODRIGUES et al., 2020). Além desses estudos, outro trabalho também demonstrou um significativo potencial de inibição da replicação do SARS-CoV-2 em células VERO E6, utilizando um composto denominado Cápsula de Liu Shen (LS) (MA et al., 2020). Os estudos citados sustentam a importância da análise de compostos que potencialmente podem mostrar ação antiviral contra o SARS-CoV-2.

Como citado anteriormente, antimaláricos também foram analisados quanto a sua ação inibitório contra o SARS-CoV-2, como é o caso da Cloroquina e Hidroxicloroquina. A Cloroquina demonstrou um possível mecanismo de ação que envolve a inibição da fusão e entrada desse vírus na célula hospedeira, porém esse composto possui limitações relacionadas a sua toxicidade (RABI et al., 2020). Já a Hidroxicloroquina possui mecanismo de ação relacionado à prevenção da entrada do vírus na célula, por meio de um aumento causado no pH endossomal (SAVARINO et al., 2003). Também foi realizado estudo observacional não randomizado de associação da Hidroxicloroquina e o antibiótico azitromicina, que demonstrou uma redução da carga viral e taxa de mortalidade (GAUTRET et al., 2020). Apesar disso, é importante ressaltar que nenhum estudo comprova uma potencial terapia com o uso desses compostos contra a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (IZCOVICH et al., 2022; JAMSHOID et al., 2020; LAUXMANN; SANTUCCI; AUTRÁN-GÓMEZ, 2020b).

Uma outra alternativa abordada é a imunoterapia, por meio do uso de anticorpos monoclonais, como Tocilizumabe, Mepolizumab e Sarilumab (ZOU et al., 2021). Apesar de estudos utilizando anticorpos monoclonais não resultarem na redução da mortalidade, foram demonstrados resultados de redução da carga viral, no caso de administração no início dos sintomas e também antes do surgimento de anticorpos anti-SARS-CoV-2 no soro de pacientes não hospitalizados (TO et al., 2021). Além dos anticorpos monoclonais, também existem estudos utilizando um tipo de terapia baseada em células-tronco (ZOU et al., 2021b). Estudos demonstraram melhora na função pulmonar de alguns pacientes infectados que foram transplantados com células-tronco mesenquimais (LENG et al., 2020). E por fim, tem-se a transfusão de plasma coalescente, porém há controvérsias em relação ao potencial de intervenção por esse tipo de tratamento contra o SARS-CoV-2 (ZOU et al., 2021b).

Como dito anteriormente, outro tipo de tratamento que está em estudo é o que envolve a medicina tradicional chinesa. Um exemplo, envolve a análise do potencial da capsula Lianhuaqingwen juntamente com o tratamento sintomático, em que resultados demonstraram aumento na taxa de recuperação e o tempo de sintomas diminuíram, além de outros resultados positivos (HU et al., 2021; ZOU et al., 2021b).

Além desses estudos, estão sendo analisados medicamentos novos, que são moléculas pequenas, com ação de impedimento de entrada do vírus na célula. O Mesilato de camostato demonstrou uma ação de bloqueio na entrada do vírus, que está relacionada com o bloqueio de serino-protease transmembranica 2 (TMPRSS2) (HOFFMANN et al., 2020). Outro exemplo de composto é o Arbidol (umifenovir), que possui atividade de inibição da endocitose, resultando em sua inclusão em testes clínicos. Ainda, estudos que demonstraram que a inibição da endocitose poderia ser realizada por meio da administração parental de ACE2 solúvel, resultando na ligação à proteína S (“spike protein”), e assim levando a endocitose celular, induziram ao desenvolvimento de um ACE2 humano recombinante (APN01), que está em ensaios clínicos para análises do potencial anti-COVID-19 (JAMSHAIID et al., 2020).

Com o surgimento das variantes, muito estudos de antivirais contra o SARS-CoV-2 passaram a também testar os compostos em variantes (ABDELNABI et al., 2021; MARTINEZ et al., 2021; SINGH et al., 2022; ZAHRADNÍK et al., 2021). Como o estudo de Carter-Timofte et al (2021) que analisou o composto antimicrobiano Atovaquona contra o vírus do tipo selvagem SARS-CoV-2, e também suas variantes Alpha, Beta, e Delta, conseguindo demonstrar o efeito antiviral em todas, inclusive em células VERO e Calu-3 (CARTER-

TIMOFTE et al., 2021). Já o estudo de Wang et al (2021) analisou a ação de doze lectinas derivadas de plantas nas variantes B.1.1.7, B.1.351, e P.1 (WANG et al., 2021).

Até o momento da escrita deste trabalho, a ANVISA possui 6 medicamentos aprovados para tratamento da COVID-19: Rendesivir, Sotrovimabe, Baricitinibe, Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir), Molnupiravir, e Tocilizumabe (ANVISA, 2024). Dois dos medicamentos aprovados são anticorpos monoclonais, o que seria problemático, pois não necessariamente possui eficácia em todos os sistemas imunológicos, dependendo do organismo de cada indivíduo responder ao tratamento. Dessa forma, apenas três são medicamentos antivirais, o que demonstra a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas, e ainda diante do panorama do surgimento de novas variantes, evidenciando a importância da disponibilização de novos estudos para a elaboração de tratamentos eficazes e com vantagens sobre os já disponibilizados contra esse vírus.

### **1.5. A ampla possibilidade de estudo envolvendo peptídeos como antivirais**

Os peptídeos são compostos de pequenos fragmentos de proteínas, que vem ganhando destaque para o estudo de potenciais antivirais. Isto ocorre devido a uma possível função desses componentes proteicos em apresentar uma barreira defensiva, mostrando que peptídeos com ação antimicrobiana podem estar associados ao estudo de diversos vírus, de forma a serem denominados peptídeos antivirais. Esses peptídeos antivirais que interagem com as partículas do vírus ou em algum alvo das etapas críticas de replicação viral do ciclo de vida podem potencialmente ser candidatos para serem utilizados como tratamento ou profilaxia (ALTMANN et al., 2012; CHINCHAR et al., 2004).

O estudo de peptídeos pode ser realizado, primeiramente, por meio de estudos *in silico*, sendo possível analisar a interação desses com algum alvo determinado, como pode ser o caso de uma glicoproteína presente na superfície do vírus ou ainda de uma determinada enzima importante no ciclo de replicação de um vírus. E devido à diversidade de características que os peptídeos possuem, como carga, tipos de composições diferentes de aminoácidos e características físico-químicas, esses compostos podem demonstrar diferentes potencialidades de atividades antivirais (OKAZAKI; KIDA, 2004; VILAS BOAS et al., 2019a)

O uso de peptídeos sintéticos como antivirais apresenta diversas vantagens, em comparação com outros compostos, pois possuem uma alta especificidade e eficácia, baixa toxicidade, baixa acumulação em tecidos, ampla gama de alvos, e apresenta menos efeitos colaterais (CASTEL et al., 2011; MARQUIS; PIROGOVA; PIVA, 2017). Além disso, os

peptídeos utilizados como antivirais já demonstraram ação principalmente na inibição da ligação do vírus e também na fusão da membrana celular do vírus, destruição do envelope do vírus, e inibição da replicação do vírus (HUAN et al., 2020). Existem diversos estudos que foram realizados *in vitro* que demonstraram a ação de peptídeos como antivirais, como, por exemplo, o peptídeo denominado LL-37 contra os vírus HCV (MATSUMURA et al., 2016), ZIKV (HE et al., 2018), HIV (PETER BERGMAN et al., 2007), e contra o vírus Dengue-2 (ALAGARASU et al., 2017). Além desses estudos, já foram analisados diversos peptídeos com ação antiviral contra coronavírus, como os peptídeos HR1P e HR2P contra o vírus MERS-CoV (LU et al., 2014), e ainda outro estudo utilizando o peptídeo à base HR2 que teria o potencial de inibir a fusão e entrada do vírus MERS-CoV (GAO et al., 2013). Já existem diversos estudos *in silico* na literatura, que utilizam de modelo computacional, com o intuito de demonstrar o potencial de peptídeos como inibidores contra o SARS-CoV-2, propondo os peptídeos analisados como compostos terapêuticos eficientes contra esse vírus (ÇAKIR et al., 2021; DE CAMPOS; PALERMO; CONDA-SHERIDAN, 2021; HAN; KRÁL, 2020; LING et al., 2020; LISCANO; OÑATE-GARZÓN; OCAMPO-IBÁÑEZ, 2020; SITTHIYOTHA; CHUNSRIVIROT, 2021). Isso demonstra que os peptídeos antivirais são compostos potencialmente promissores para o estudo contra o vírus SARS-CoV-2.

Estudos sugerem o uso de drogas à base de peptídeos como adjuvantes ou ainda em combinação com outros antivirais com diferentes mecanismos de ação, de maneira a resultar em uma diminuição do estabelecimento da resistência aos medicamentos e gerar menos efeitos colaterais (VILAS BOAS et al., 2019a). Além disso, a descrição de novos antivirais complementa as terapias existentes e oferece alternativas para o tratamento de doenças virais que causam graves pandemias, reduzindo a mortalidade/morbidade a elas associadas (VILAS BOAS et al., 2019b).

O principal peptídeo do presente trabalho (MR1903) possui como característica ser um dimérico ((p-BthTX-I)<sub>2</sub>K), que foi derivado a partir da estrutura da miotoxina Bothropstoxin-I, do veneno da cobra *Bothrops jararacussu*. Essa miotoxina já possui atividade antimicrobial demonstrada na literatura (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; BARBOSA et al., 2005; CINTRA et al., 1993). E mais recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou a atividade antiviral do dimérico derivado dessa miotoxina contra os vírus Chikungunya e Zika (AYUSSO et al., 2023).

A partir do dimérico MR1903 ((KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K) e com o intuito de explorar a relação entre a dimerização de peptídeos e o efeito antiviral, outros peptídeos foram

sintetizados, um tetrâmero (PE1940, KKYRYHLKPF)<sub>4</sub> (K)<sub>2</sub>K, um monômero (EMC2109, KKYRYHLKPF), e um linear (MR2024, KKYRYHLKPF<sub>4</sub>FPKLHYRYKK).

Além disso, foram elaborados outros dois peptídeos (MC1947, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K-YGRKKRRQRRR e MC1937, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K-KRLRWR), com a estrutura do dímero, porém com adição de peptídeos com características de penetração celular. Essa estratégia foi utilizada por conta da barreira presente na membrana das células, pois essa seleciona a entrada de moléculas, o que pode representar um problema durante a testagem de compostos contra microorganismos (LUNDBERG; LANGEL, 2003). Por conta disso se justifica a escolha de peptídeos com característica de penetração celular, que tem a capacidade de adentrar as membranas celulares usando processos independente ou dependente de energia (NEUNDORF, 2019).

A estereoquímica de moléculas explica as duas possíveis configurações para aminoácidos em peptídeos, podendo ser levógiro ou dextrógiro (GENCHI, 2017). E diante a isso, o último peptídeo foi elaborado para o estudo (NB2080, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K (D-aa)), composto por D-aminoácidos, ao invés de L-aminoácidos, como é o caso do dímero MR1903, de maneira a comparar os resultados obtidos.

Dessa maneira, diante do atual quadro de pandemia e o grande problema de saúde pública mundial que o vírus SARS-CoV-2 representa, juntamente com o potencial de estudos com peptídeos antivirais, faz de suma importância o estudo de peptídeos sintéticos e sua ação inibitória contra células infectadas com diferentes variantes do vírus SARS-CoV-2.

## References

1. Lauxmann MA, Santucci NE, Autrán-Gómez AM. The SARS-CoV-2 Coronavirus and the COVID-19 Outbreak. *International braz j urol*. 2020;46: 6–18. doi:10.1590/s1677-5538.ibju.2020.s101
2. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19: 155–170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
3. Jamshaid H, Zahid F, Din I ud, Zeb A, Choi HG, Khan GM, et al. Diagnostic and Treatment Strategies for COVID-19. *AAPS PharmSciTech*. 2020;21: 222. doi:10.1208/s12249-020-01756-3
4. Musarrat F, Chouljenko V, Dahal A, Nabi R, Chouljenko T, Jois SD, et al. The anti-HIV drug nelfinavir mesylate (Viracept) is a potent inhibitor of cell fusion caused by the SARSCoV-2 spike (S) glycoprotein warranting further evaluation as an antiviral against COVID-19 infections. *J Med Virol*. 2020;92: 2087–2095. doi:10.1002/jmv.25985
5. Zhao M, Zhang J, Li H, Luo Z, Ye J, Xu Y, et al. Recent progress of antiviral therapy for coronavirus disease 2019. *Eur J Pharmacol*. 2021;890: 173646. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173646
6. Wang X, Cao R, Zhang H, Liu J, Xu M, Hu H, et al. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discov*. 2020;6: 28. doi:10.1038/s41421-020-0169-8
7. Yao T, Qian J, Zhu W, Wang Y, Wang G. A systematic review of lopinavir therapy for SARS coronavirus and MERS coronavirus—A possible reference for coronavirus disease-19 treatment option. *J Med Virol*. 2020;92: 556–563. doi:10.1002/jmv.25729
8. Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, Dienemann C, Seitz F, Schmitzova J, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat Commun*. 2021;12: 279. doi:10.1038/s41467-020-20542-0
9. Heydari H, Golmohammadi R, Mirnejad R, Tebyanian H, Fasihi-Ramandi M, Moosazadeh Moghaddam M. Antiviral peptides against Coronaviridae family: A review. *Peptides (NY)*. 2021;139: 170526. doi:10.1016/j.peptides.2021.170526

10. Souza PFN, Marques LSM, Oliveira JTA, Lima PG, Dias LP, Neto NAS, et al. Synthetic antimicrobial peptides: From choice of the best sequences to action mechanisms. *Biochimie*. 2020;175: 132–145. doi:10.1016/j.biochi.2020.05.016
11. Amer LS, Bishop BM, van Hoek ML. Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396: 246–251. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.073
12. Rigano MM, Romanelli A, Fulgione A, Nocerino N, D'Agostino N, Avitabile C, et al. A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. *Journal of Peptide Science*. 2012;18: 755–762. doi:10.1002/psc.2462
13. Ciociola T, Giovati L, Conti S, Magliani W, Santinoli C, Polonelli L. Natural and synthetic peptides with antifungal activity. *Future Med Chem*. 2016;8: 1413–1433. doi:10.4155/fmc-2016-0035
14. Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of Dengue Virus Entry into Target Cells Using Synthetic Antiviral Peptides. *Int J Med Sci*. 2013;10: 719–729. doi:10.7150/ijms.5037
15. Skalickova S, Heger Z, Krejcova L, Pekarik V, Bastl K, Janda J, et al. Perspective of Use of Antiviral Peptides against Influenza Virus. *Viruses*. 2015;7: 5428–5442. doi:10.3390/v7102883
16. Masuda M, Nakashima H, Ueda T, Naba H, Ikoma R, Otaka A, et al. A novel anti-HIV synthetic peptide, T-22 ([Tyr<sup>5,12</sup>,Lys<sup>7</sup>]-polyphemusin II). *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189: 845–850. doi:10.1016/0006-291X(92)92280-B
17. Mustafa S, Balkhy H, Gabere MN. Current treatment options and the role of peptides as potential therapeutic components for Middle East Respiratory Syndrome (MERS): A review. *J Infect Public Health*. 2018;11: 9–17. doi:10.1016/j.jiph.2017.08.009
18. Tonk M, Růžek D, Vilcinskis A. Compelling Evidence for the Activity of Antiviral Peptides against SARS-CoV-2. *Viruses*. 2021;13: 912. doi:10.3390/v13050912
19. Ayusso GM, Lima MLD, da Silva Sanches PR, Santos IA, Martins DOS, da Conceição PJP, et al. The Dimeric Peptide (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K Shows Broad-Spectrum Antiviral Activity by Inhibiting Different Steps of Chikungunya and Zika Virus Infection. *Viruses*. 2023;15: 1168. doi:10.3390/v15051168

20. Genchi G. An overview on d-amino acids. *Amino Acids*. 2017;49: 1521–1533. doi:10.1007/s00726-017-2459-5
21. Merrifield RB, Merrifield EL, Juvvadi P, Andreu D, Boman HG. Design and Synthesis of Antimicrobial Peptides. 2007. pp. 5–26. doi:10.1002/9780470514658.ch2
22. Rihn SJ, Merits A, Bakshi S, Turnbull ML, Wickenhagen A, Alexander AJT, et al. A plasmid DNA-launched SARS-CoV-2 reverse genetics system and coronavirus toolkit for COVID-19 research. *PLoS Biol*. 2021;19: e3001091. doi:10.1371/journal.pbio.3001091
23. SPEARMAN C. THE METHOD OF ‘RIGHT AND WRONG CASES’ (‘CONSTANT STIMULI’) WITHOUT GAUSS’S FORMULAE. *British Journal of Psychology*, 1904-1920. 1908;2: 227–242. doi:10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x
24. Batista MN, Sanches PR da S, Carneiro BM, Braga ACS, Campos GRF, Cilli EM, et al. GA-Hecate antiviral properties on HCV whole cycle represent a new antiviral class and open the door for the development of broad spectrum antivirals. *Sci Rep*. 2018;8: 14329. doi:10.1038/s41598-018-32176-w
25. Oliveira DM de, Santos I de A, Martins DOS, Gonçalves YG, Cardoso-Sousa L, Sabino-Silva R, et al. Organometallic Complex Strongly Impairs Chikungunya Virus Entry to the Host Cells. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.608924
26. Oo A, Rausalu K, Merits A, Higgs S, Vanlandingham D, Bakar SA, et al. Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral Res*. 2018;150: 101–111. doi:10.1016/j.antiviral.2017.12.012
27. Liscano Y, Oñate-Garzón J, Ocampo-Ibáñez ID. In Silico Discovery of Antimicrobial Peptides as an Alternative to Control SARS-CoV-2. *Molecules*. 2020;25: 5535. doi:10.3390/molecules25235535
28. Tonk M, Růžek D, Vilcinskas A. Compelling Evidence for the Activity of Antiviral Peptides against SARS-CoV-2. *Viruses*. 2021;13: 912. doi:10.3390/v13050912
29. Elnagdy S, AlKhazindar M. The Potential of Antimicrobial Peptides as an Antiviral Therapy against COVID-19. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2020;3: 780–782. doi:10.1021/acspsci.0c00059

30. Schütz D, Ruiz-Blanco YB, Münch J, Kirchhoff F, Sanchez-Garcia E, Müller JA. Peptide and peptide-based inhibitors of SARS-CoV-2 entry. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;167: 47–65. doi:10.1016/j.addr.2020.11.007
31. Czuppon P, Débarre F, Gonçalves A, Tenailon O, Perelson AS, Guedj J, et al. Success of prophylactic antiviral therapy for SARS-CoV-2: Predicted critical efficacies and impact of different drug-specific mechanisms of action. *PLoS Comput Biol.* 2021;17: e1008752. doi:10.1371/journal.pcbi.1008752
32. Shapira T, Monreal IA, Dion SP, Buchholz DW, Imbiakha B, Olmstead AD, et al. A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature.* 2022;605: 340–348. doi:10.1038/s41586-022-04661-w
33. Abou-Hamdan M, Saleh R, Mani S, Dournaud P, Metifiot M, Blondot ML, et al. Potential antiviral effects of pantethine against SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2023;13: 2237. doi:10.1038/s41598-023-29245-0
34. Cao R, Hu H, Li Y, Wang X, Xu M, Liu J, et al. Anti-SARS-CoV-2 Potential of Artemisinins In Vitro. *ACS Infect Dis.* 2020;6: 2524–2531. doi:10.1021/acsinfecdis.0c00522
35. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19: 155–170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
36. Al-Horani RA, Kar S. Potential Anti-SARS-CoV-2 Therapeutics That Target the Post-Entry Stages of the Viral Life Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses.* 2020;12: 1092. doi:10.3390/v12101092

**CAPÍTULO V –  
Conclusão**

- A análise da viabilidade celular possibilitou a seleção de uma máxima concentração não citotóxica (acima ou igual a 80% de viabilidade) para todos os peptídeos testados em linhagens Vero, A549 e BHK-21;

- Dentre os peptídeos analisados quanto ação antiviral, apenas MR1903 ((KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K), PE1940, (KKYRYHLKPF)<sub>4</sub> (K)<sub>2</sub>K, MC1947, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K-YGRKKRRQRRR, MC1937, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K-KRLRWR) e NB2080, (KKYRYHLKPF)<sub>2</sub>K (D-aa) apresentaram potencial antiviral contra a cepa do tipo selvagem de Wuhan do SARS-CoV-2, utilizando células Vero e A549 infectadas, para análises do efeito desses peptídeos;

- Ainda, todos os peptídeos apresentaram potencial antiviral também contra as variantes Omicron e Delta de SARS-CoV-2. Com exceção do peptídeo NB2080, que não apresentou inibição contra essas variantes e seu efeito se limita ao vírus original;

- O peptídeo MR1903 demonstra potencial como um composto, principalmente, para profilaxia ou tratamento preventivo, já que apresentou efeito profilático, além de também em etapas após a entrada, em células A549 infectadas com SARS-CoV-2. Já em células Vero, esse peptídeo apresentou efeito também na etapa da entrada. O peptídeo PE1940 tem maior destaque no seu efeito para etapas mais tardias de um tratamento, já que causa efeito na entrada, mas também é responsável por inibir estágios após o vírus entrar na célula, em células A549 infectadas com o vírus. Porém, em células Vero, esse peptídeo também causou efeito virucida.

Já os peptídeos MC1947 e MC1937, devido a ação em diversas etapas do ciclo replicativo, esses compostos apresentam o potencial para um tratamento com diversos alvos, e até mesmo para o uso em ação conjunta. Essa conclusão é resultado da adição de peptídeos de penetração celular ao peptídeo dimérico que resultou nos peptídeos MC1937 e MC1947 demonstrou que esses são capazes de uma inibição em todas as etapas testadas, de forma que, possuem atividade virucida, efeito na entrada do vírus nas células, e ainda, ação nas etapas posteriores a entrada do vírus, em células Vero e A549 infectadas por SARS-CoV-2, e ainda um efeito profilático, em células A549.

O isômero (NB2080) do peptídeo dimérico MR1903 demonstrou possuir um mecanismo de ação semelhante a este, com ação no pré tratamento das células e em etapas após a infecção. Além disso, o estudo deste peptídeo concluiu que um peptídeo L-amino ácido é mais potentes do que o D-amino ácido, devido o maior valor de índice de seletividade do dimérico MR1903.

- Os peptídeos MR1903, PE1940, MC1937 e MC1947 foram capazes de inibir o replicon subgenômico, e isso afirma o potencial desses peptídeos de inibir a etapa de replicação;
- Resultados da análise do RNA dupla fita sintético mostraram que todos os peptídeos apresentaram potencial de degradação dessa dupla fita, outro resultado que corrobora com o potencial desses em afetar a etapa de replicação viral;
- Além disso, foi possível identificar algumas deleções no genoma viral relacionado a adaptação do vírus ao tratamento com os peptídeos MR1903 e PE1940, porém para o peptídeo MR1903 a mesma região de deleção também foi encontrada no controle, o que impossibilita a conclusão de uma associação entre essa alteração com a adaptação do vírus ao tratamento. Já a deleção no tratamento com PE1940 está associada com a ORF6 que já representa um alvo antiviral em estudos com SARS-CoV-2. Os tratamentos com os peptídeos MC1937 e MC1947 resultaram em adaptação do vírus após seis passagens, com os mesmo tipos de alterações no genoma para os dois peptídeos, relacionadas a proteína E e a S.

.