

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

ANA BEATRIZ GASPAR

**COMPOSTOS DOADORES DE ÓXIDO-NÍTRICO COMO POTENCIAIS
INIBIDORES DE SARS-COV-2**
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Diadema, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

ANA BEATRIZ GASPAR

**Compostos doadores de óxido-nítrico como potenciais inibidores
do SARS-CoV-2. (Revisão Bibliográfica)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DA UNIDADE
CURRICULAR PROJETOS DIRIGIDOS EM
QUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM
QUÍMICA.

PROF. ADRIANA KARLA CARDOSO AMORIM REIS
ORIENTADOR

Diadema, 2022

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Gaspar, Ana Beatriz

Compostos doadores de óxido-nítrico como potenciais inibidores de SARS-CoV-2: Revisão Bibliográfica / Ana Beatriz Gaspar. – – Diadema, 2022.

45 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2022.

Orientadora: Adriana Karla Cardoso Amorim Reis

1. Doadores de NO. 2. S-nitrosotiois. 3. inibição de protease. 4. SARS-COV-2. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer meus pais, Cássia e Luiz Carlos Gaspar, por todo apoio e amor que me deram durante minha vida inteira e sempre incentivarem os meus estudos e reconhecerem meu esforço, não chegaria até aqui sem eles. Estendo meus agradecimentos à minha irmã, Ana Laura, que sempre foi uma companheira e me ajudou quando precisei.

O período na faculdade é um dos mais desafiantes, mas com a companhia certa o caminho é mais suave. Começo agradecendo meu tempo na UNIFESP a minha professora orientadora, Adriana Karla, por me dar a chance de conhecer mais desse mundo científico me aceitando no seu laboratório para iniciação científica, onde aprendi muito nesse tempo, e também me auxiliou no desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso. Estendo meus agradecimentos aos meus colegas do Lab 18, que compartilharam de toda experiência da pesquisa científica. Também sou grata pelas amizades que fiz ao longo da graduação, que foram essenciais para chegar onde estou agora, Vanessa, Rafaela Hio, Matheus, Ana Layla.

Sou imensamente grata as minhas amigas que me apoiaram, ouviram e ajudaram durante esses anos de faculdade e em todos os anos de amizade, Alessandra, Giulia e Sofia.

Acima de tudo, sou grata a Deus por tê-Lo guiando meus passos.

“A Química Orgânica me encontrou tanto quanto eu a encontrei. ”

— David Macmillan, Prêmio Nobel de Química em 2021.

“Tente seguir seu entusiasmo e fazer o que você realmente ama. ”

— Benjamin List, Prêmio Nobel de Química em 2021.

“We are all literary chameleons and I think it’s fascinating. It’s just a continuation of the idea that we are so many things, all the time. And I know it can be really overwhelming figuring out who to be, and when. [...] I have some good news: it’s totally up to you. I also have some terrifying news: it’s totally up to you.

[...] As long as we are fortunate enough to be breathing, we will breathe in, breathe through, breathe deep, breathe out. ”

— Discurso de Taylor Swift para turma de 2022 da NYU.

RESUMO

As proteases de vírus são alvos interessantes para o tratamento de doenças, como do HIV e Hepatite C. A protease principal do vírus SARS-CoV-2 possui um resíduo de cisteína, que pode S-nitrosilada na presença de óxido nítrico (NO), a modificação do grupo tiol (SH) leva a inativação da protease, que é responsável pelo processamento das poliproteínas que estão envolvidas na replicação viral. Compostos doadores de NO possuem a habilidade de liberar o radical, *in vivo*, para que a reação de S-nitrosilação ocorra. Alguns doadores já são conhecidos, como nitratos orgânicos e NONOatos. Uma nova classe que está ganhando visibilidade são os S-nitrosotiois, que possuem potencial para agirem como inibidores de cisteíno-proteases. Em 2020, foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a pandemia global de COVID-19. Essa doença é causada pelo vírus SARS-CoV-2, uma nova espécie de coronavírus. As proteases virais do novo coronavírus possuem resíduos de cisteína livres que são essenciais na replicação do RNA do genoma viral no organismo, após a reação de S-nitrosilação essa ação fica comprometida. O NO também tem a capacidade de diminuir a superprodução de interleucinas, TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) e dímeros-D.

Palavras-Chaves: Doadores de NO; S-nitrosotiois; inibição de protease; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Virus proteases are interesting targets for the treatment of diseases such as HIV and Hepatitis C. The main protease of the SARS-CoV-2 virus has a cysteine residue, which can be S-nitrosylated in the presence of nitric oxide (NO), modification of the thiol group (SH) leads to inactivation of the protease, which is responsible for processing the polyproteins that are involved in viral replication. NO donor compounds have the ability to free the radical, in vivo, for the S-nitrosylation reaction to occur. Some donors are already known, such as organic nitrates and NONOates. A new class that is gaining visibility are the S-nitrosothiols, which have the potential to act as inhibitors of cysteine proteases. In 2020, the World Health Organization (WHO) declared the global pandemic of COVID-19. This disease is caused by the SARS-CoV-2 virus, a new species of coronavirus. The viral proteases of the new coronavirus have free cysteine residues that are essential in the replication of the RNA of the viral genome in the body, after the S-nitrosylation reaction this action is compromised. NO also has the ability to decrease the overproduction of interleukins, TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) and D-dimers.

Keywords: NO donors; S-nitrosothiols; protease inhibition; SARS-CoV-2.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Proteases	10
1.2 Óxido Nítrico (NO).....	11
1.2.1 Características do NO e óxido nítrico sintases (NOS)	12
1.3 Coronavírus e as proteases virais.....	16
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	20
3. METODOLOGIA.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Doadores de NO	22
4.1.1 Nitratos orgânicos	22
4.1.2 Diazenodiolatos: NONOates	23
4.1.3 S-nitrosotióis	25
4.1.3.1 Estrutura e estabilidade dos S-nitrosotiois	27
4.2 Inibição da atividade de proteínas por S-nitrosilação.....	28
4.3 SARS-CoV-2: estrutura e protease	29
4.4 A replicação do SARS-CoV-2	30
4.5 Inibição da protease principal do SARS-CoV-2	31
4.6 O NO no tratamento de Covid-19: uso e benefícios.....	31
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Esquema simplificado da oxidação de cisteínas por óxido nítrico (NO) para formação de S-nitrosotióis, onde ocorre o ataque do ânion tiolato (RS^-) ao nitrogênio a (reproduzido de BIGNON et al., 2018).	12
Figura 2: Estrutura de Lewis do óxido Nítrico. Estão destacados os elétrons de valência tanto do nitrogênio quanto do oxigênio. Devido aos elétrons desemparelhados do nitrogênio, o NO é radical muito reativo (reprodução autoral). 13	13
Figura 3: Orbital molecular do Óxido Nítrico, onde é possível ver os elétrons dos átomos de nitrogênio (à esquerda) de oxigênio (à direita) que participam da ligação e o elétron desemparelhado no orbital $2\pi^*$. (Retirado e adaptado de Atkins, et al.)	13
Figura 4: estruturas do GTP (à esquerda) e cGMP (à direita). (Retirados de Lehninger, et al.)	14
Figura 5: formação do NO a partir da L-arginina. (a) esquema simplificado da cascata de reação causada pela formação de NO. (b) estruturas das moléculas participantes da formação de NO. (Retirado e adaptado de: HUERTA, et al; DUSSE, et al)	15
Figura 6: Estrutura do vírus SARS-CoV-2. (Retirado de: A. Paul et al.)	17
Figura 7: Estrutura cristalina de uma única cadeia da M^{PRO} destacando os resíduos de cisteína e histidina. (Retirado de DAS et al., 2021)	18
Figura 8: estrutura do nirmatrelvir (à esquerda) e do ritonavir (à direita) (retirado de MedChemExpress e ChemicalBook).....	20
Figura 9: estruturas da nitroglicerina e do tetranitrato de pentaeritrina.	22
Figura 10: A forma aniônica existe em ressonância (retirado de: Rivera-Tirado, et al.)	23
Figura 11: Exemplos de NONOates: (A) Sal de Angelis; (B) DEA NONOate; (C) DETA NONOate; (D) PAPA NONOate. (Retirado e adaptado de Shaik, et al)	24
Figura 12: Decomposição do Sal de Angelis (retirado de Miranda, et al).....	24
Figura 13: Decomposição de N-diazenodiolatos a pH neutro, onde X= grupo amino (retirado de: Fitzhugh, et al.)	25
Figura 14: Estruturas de S-nitrosotióis: GSNO, SNAP e NACNO (Fonte autoral)....	27
Figura 15: Estruturas sCis e sTrans de S-nitrosotióis (Retirado de Timerghazin, et al.)	28

Figura 16: S é referente a estrutura neutra; D, zwitteriônico, a dupla ligação S=N; e I, ao par iônico que existe devido a fraqueza da ligação S-N (retirado de Timerghazin et al).	28
Figura 17: Molécula do RRx-001, doador de NO (retirado de Oronsky, et al.)	32
Figura 18: Fórmula estrutural da Hidroxiureia. (Fonte autoral).....	33
Figura 19: Estrutura do núcleo do furoxano. (Fonte autoral).	34
Figura 20: a) Composto 22; b) Compostos 26. (Retirado de AL-SEHEMI et al.).....	35
Figura 21: inibidor de MPRO carboxamida de imidazol, X77 (Fonte autoral).....	35
Figura 22: estrutura do Ebselen. (Fonte autoral).....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

As enzimas proteolíticas, peptidases ou proteases, constituem a maior família de enzimas conhecida. Tais enzimas catalisam a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas. Algumas proteases clivam apenas uma ligação peptídica específica de determinados resíduos de aminoácidos e, portanto, fragmentam uma cadeia polipeptídica de uma maneira previsível e reproduzível. As proteases também são essenciais para replicação e transmissão de vírus, parasitas e bactérias que causam doenças infecciosas (ABBENANTE; FAIRLIE, 2006).

Endoproteases são enzimas que quebram ligações internas da cadeia polipeptídica. Elas são classificadas de acordo com o mecanismo catalítico e suas famílias, sendo estas: aspartato, serino, cisteíno e proteases metálicas. (CARELLI et al., 2020).

Cisteíno-protease é uma das classes de enzimas proteolíticas bem conhecida. Entre as classes de protease de cisteína podemos destacar a papaína e as caspases. Algumas são lisossomais, então são mais ativas em pH ácido, como as cathepsinas. Também são reconhecidas como enzimas multifuncionais, pois agem no processamento hormonal, na degradação de proteínas para apresentação de antígeno e reabsorção de tecido. (CARELLI et al., 2020)

A ação dessas proteases é controlada, *in vivo*, por diversos mecanismos: regulação da expressão gênica e bloqueio por inibidores endógenos em lisossomos, mitocôndrias e membranas apicais (porção da célula epitelial voltada para o meio externo ou cavidade (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017)). Também atuam na inibição da atividade dessas proteases modificações pós-transcrição, como glicosilação, ligação a metais, pontes dissulfetos e proteólise. Mas, além disso, existem os inibidores de protease, que são proteínas que agem no controle da ação catalítica das enzimas proteolíticas (CARELLI et al., 2020).

1.2 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) tem diversas funções fisiopatológicas e fisiológicas, como segundo-mensageiro, ativando ou inibindo moléculas de controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro. NO não é armazenado *in vivo*, mas sintetizado conforme a necessidade do organismo estendendo-se até o sítio de ação. O sistema imunológico produz quantidades significativas de NO durante o processo inflamatório por macrófagos e outras células que expressam a NO sintase. O NO então produzido, causa danos oxidativos letais às células alvos de vírus e bactérias (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005).

A interação do NO com moléculas e enzimas que possuem um grupo sulfidril tem mostrado importância. Basicamente, qualquer proteína com uma porção tiol livre pode ser S-nitrosilada, ou seja, ocorre o acoplamento de um grupo NO a o sítio reativo tiol de resíduos de cisteína (porém, a nitroação endógena se mostra mais seletiva). Entre os vários compostos doadores de NO, com variados estados redox, os S-nitrosotióis tem se destacado. São doadores de óxido nítrico, cujo mecanismo ocorre através da liberação do cátion nitrosônio (NO^+), que tem uma vida relativamente curta, e se adiciona diretamente a grupos sulfidril de cisteínas (MIERSCH; MUTUS, 2005; MIYAMOTO et al., 2000). Possuem a fórmula geral RSNO, onde R geralmente é uma proteína, peptídeo ou aminoácido (FERRO, 2012). Entre os RSNOs endógenos podemos destacar a S-nitrosoalbumina (SNO-albumina), S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitrosocisteína (SNO-cisteína).

A porção tiol das cisteínas são os resíduos de proteínas mais fáceis de serem oxidados, resultando em reticulação de proteínas intermoleculares e inativação de enzimas. A modificação da cisteína afeta a atividade de proteínas citosólicas e de membrana de bactérias e vírus (SEHAJPAL et al., 1999; XIAN et al., 2000). Formalmente, a S-nitroação ocorre tanto pela reação de oxidação do NO com a porção tiol da cisteína na presença de um aceptor de elétrons (metal de transição ou O_2) ou pela transferência de NO^+ de S-nitrosotióis doadores (FOSTER; FORRESTER; STAMLER, 2009).

O óxido nítrico de S-nitrosotióis é liberado facilmente na presença de grupos tióis, via ataque nucleofílico do nitrogênio da porção S-NO pelo ânion tiolato. A S-nitroação de proteínas ocorre em resíduos de cisteína e regula a função, a atividade

e a estabilidade proteica (DERAKHSHAN; WILLE; GROSS, 2007). A Figura 1 ilustra a oxidação da porção tiol da cisteína pelo óxido nítrico com formação de RSNO.

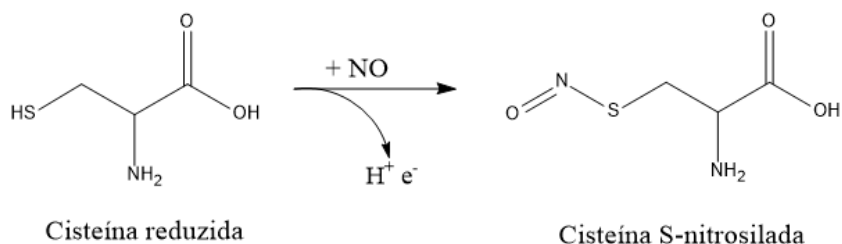


Figura 1: Esquema simplificado da oxidação de cisteínas por óxido nítrico (NO) para formação de S-nitrosotióis, onde ocorre o ataque do ânion tiolato (RS⁻) ao nitrogênio a (reproduzido de BIGNON et al., 2018).

Uma reação já reportada na literatura é, por exemplo, a nitrosilação do sítio ativo de resíduo de cisteína da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima glicolítica que é inativada e também tem sua afinidade pela membrana dos glóbulos vermelhos reduzida. Também é conhecida a S-nitrosilação da Cys215 da proteína tirosina fosfatase (PTP) por compostos doadores de NO (como *N*-nitrosoanilinas), causando sua inibição. Estudos feitos com a papaína, uma cisteíno-protease, indicam que a inibição de sua atividade acontece a partir da S-nitrosilação da porção tiol livre do resíduo de um resíduo de cisteína (WANG et al., 2012)

1.2.1 Características do NO e óxido nítrico sintases (NOS)

O óxido nítrico (NO), é uma molécula diatômica endógena que desempenha um papel regulador em muitos processos fisiológicos e patológicos. O radical livre afeta diferentes funções fisiológicas e celulares e participa de muitas funções regulatórias, que vão desde a mudança do sistema cardiovascular até a regulação das funções neuronais (YANG; HUANG; LI, 2021).

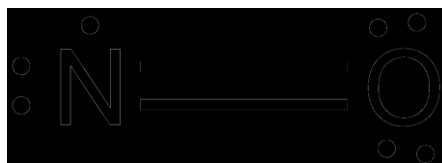


Figura 2: Estrutura de Lewis do óxido Nítrico. Estão destacados os elétrons de valência tanto do nitrogênio quanto do oxigênio. Devido aos elétrons desemparelhados do nitrogênio, o NO é radical muito reativo (reprodução autoral).

NO possui um par de elétrons desemparelhado que desempenha papel importante como neurotransmissor. Por ser um radical, a espécie é muito reativa e rapidamente eliminada e por ser pequena, se locomove pelos vasos sanguíneos (ATKINS; JONES, 2010). A configuração eletrônica da molécula de NO é: $(s2s)^2 (s2s^*)^2 (s2pz)^2 (p2p)^4 (p2p^*)^1$, na figura abaixo é apresentado o orbital molecular do NO, devido ao elétron desemparelhado a molécula é paramagnética, característica importante para as interações com NO, já que ocorrem pela estabilização desse elétron (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

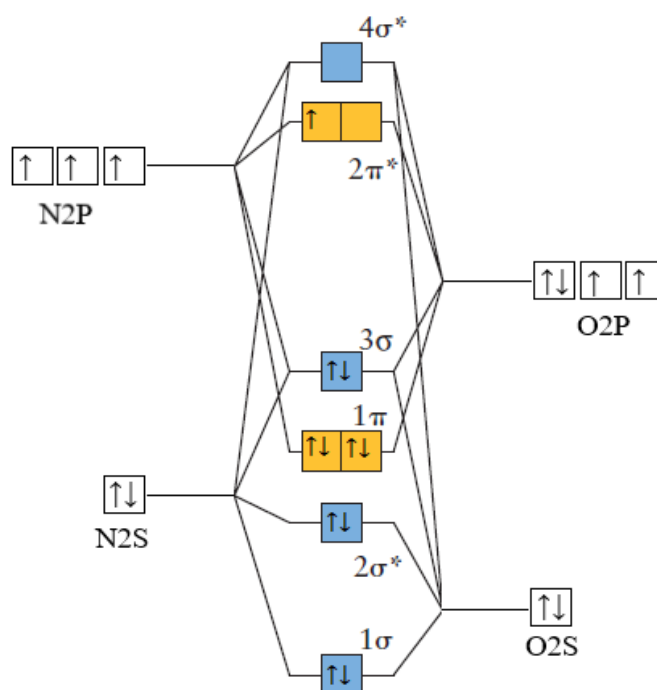


Figura 3: Orbital molecular do Óxido Nítrico, onde é possível ver os elétrons dos átomos de nitrogênio (à esquerda) de oxigênio (à direita) que participam da ligação e o elétron desemparelhado no orbital $2\pi^*$. (Retirado e adaptado de Atkins, *et al.*)

NO celular é gerado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, gerando o radical $\text{NO}\cdot$ e L-citrulina. Esse processo ocorre sob ação enzimática da óxido nítrico sintase (NOS) e precisa de NADPH e O_2 (WANG *et al.*, 2002). O par de elétrons isolado do radical $\text{NO}\cdot$ permite que o mesmo oxide a NO^+ ou seja reduzido a NO^- . A

espécie também pode reagir com o ânion O_2^- e gerar peroxinitrito, $ONOO^-$ (HUERTA; CHILKA; BONAVIDA, 2008).

O NO tem a capacidade de ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que faz parte da família de enzimas ciclizantes de nucleotídeos, e são enzimas de transdução de sinal que catalisam a conversão de guanosina trifosfato (GTP) (figura 5) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (figura 5). A guanilato ciclase solúvel (sCG) é um receptor intracelular para ligantes gasosos, como NO.

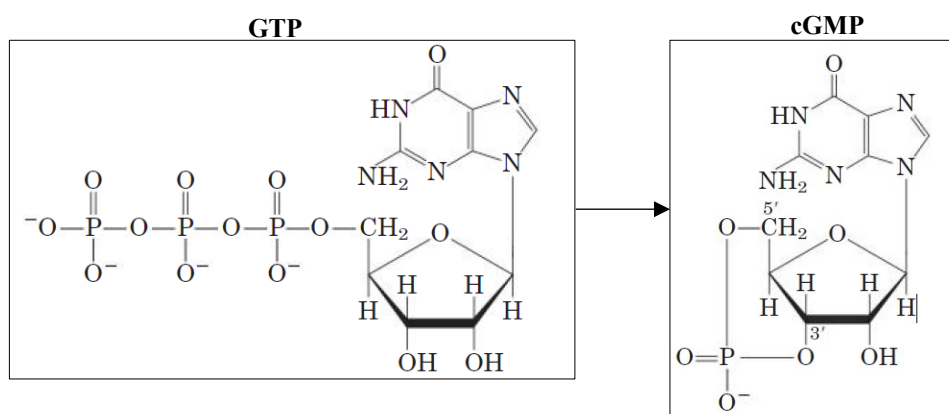


Figura 4: estruturas do GTP (à esquerda) e cGMP (à direita). (Retirados de Lehninger, *et al.*)

Essa enzima é um heterodímero composto por subunidades α e β e, essa última, possui um amino-terminal de ligação heme. O sCG é ativado por concentrações nanomolar de NO na presença da porção heme reduzida Fe^{2+} . A ativação da sCG induz a formação de cGMP, fosforilação da proteína G, proteína quinase A, as enzimas fosfodiesterase e canais de íons dependentes de nucleotídeos cíclicos e fosfodiesterase. Esse caminho leva à broncodilatação e vasodilatação (DUPONT *et al.*, 2014; HUERTA; CHILKA; BONAVIDA, 2008).

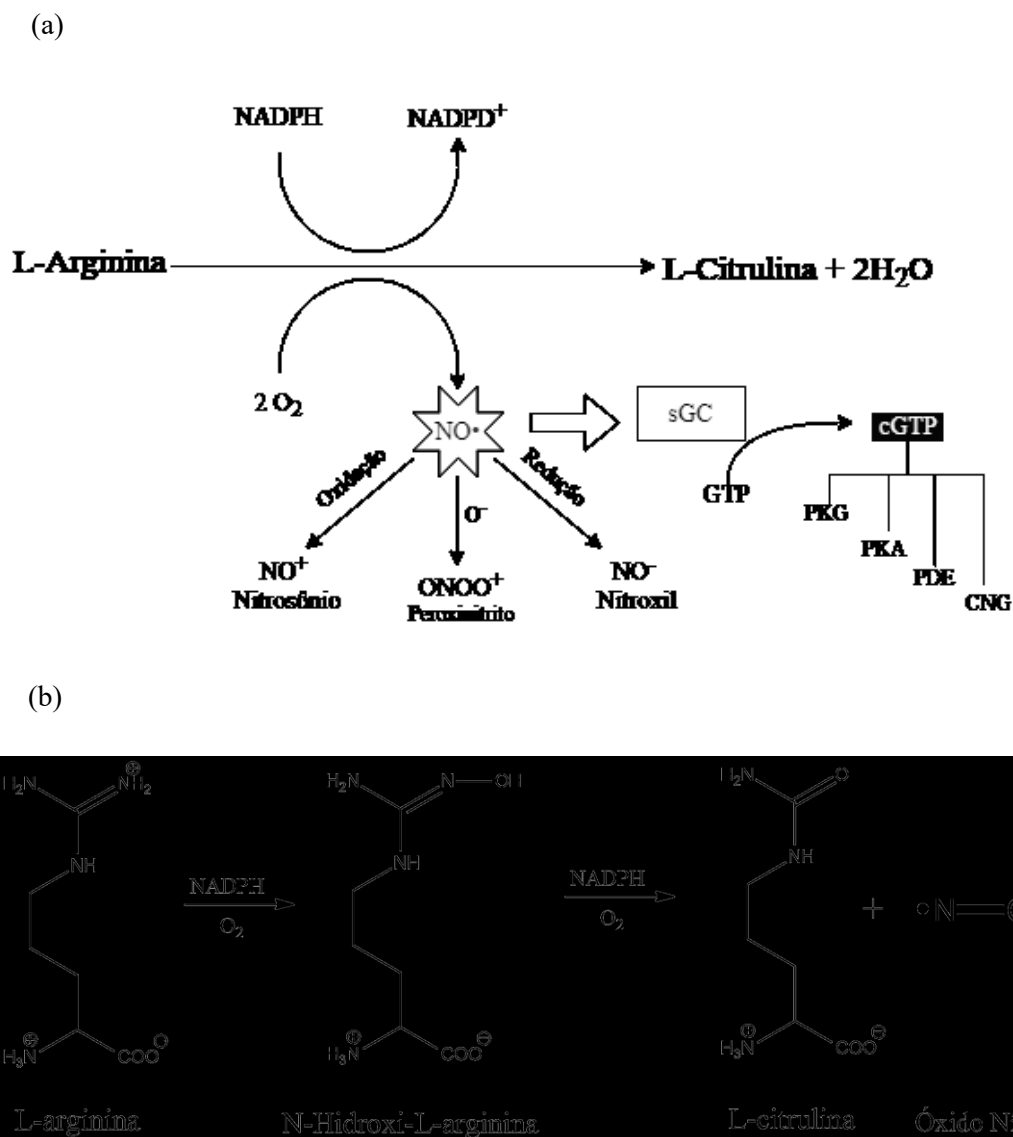


Figura 5: formação do NO a partir da L-arginina. (a) esquema simplificado da cascata de reação causada pela formação de NO. (b) estruturas das moléculas participantes da formação de NO.

(Retirado e adaptado de: HUERTA, *et al*; DUSSE, *et al*)

Isoenzimas são proteínas diferentes que catalisam a mesma reação, elas podem ter sequências de aminoácidos parecidas, mas não iguais (NELSON; COX, 2019). Existem três isoenzimas das NOS: NOS-I (nNOS); NOS-II (iNOS) e NOS-III (eNOS). A primeira isoforma está presente no cérebro e sua principal função é neurotransmissão. A presença de nNOS já foi detectada também em tecidos como o muscular estriado esquelético e células epiteliais do pulmão (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

As enzimas iNOS são capazes de produzir NO por muito tempo e, por causa disso, estão envolvidas em vários processos patológicos. Essa isoforma de NOS é induzida em macrófagos e outras células por ação de lipopolissacarídeos. Esse tipo de molécula se encontra abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas e amplificam reações inflamatórias (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). E, por fim, as eNOS são expressas nas células endoteliais e participam do controle do tônus muscular e formação da angiogênese (HUERTA; CHILKA; BONAVIDA, 2008).

Essas enzimas também dependem de cálcio para ativação. O íon Ca^{2+} se liga a uma proteína citoplasmática chamada calmodulina e forma o complexo Ca^{2+} /calmodulina, que regula as atividades enzimáticas intracelulares. Quando a concentração de Ca^{2+} diminui, o complexo é desfeito e a enzima, inativada. nNO e eNO são dependentes do Ca^{2+} para poderem se ligar a proteína calmodulina, mas a enzima iNO não é, devido a uma estrutura de aminoácidos diferente do local de ligação da calmodulina (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

O NO pode participar de vias de sinalização celular que regulam a função e atividades das células. A priori, achava-se que servia apenas para ativação da Guanilato Ciclase para formar Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPc) através da ligação direta do NO ao grupo heme da enzima Guanilato Ciclase. Mas, posteriormente, foi mostrado que a molécula tem como alvo proteínas com grupos tiois e formam S-nitrosotiois, que regula suas atividades (ASTIER et al., 2011; FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003; HESS et al., 2001; NAKAMURA; LIPTON, 2013).

1.3 Coronavírus e as proteases virais

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a pandemia global causada pelo vírus Sars-CoV-2, pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, causador da doença COVID-19 (coronavirus disease). Essa doença é altamente transmissível por meio de secreções contaminadas, a partir de gotículas respiratórias ou contato com superfícies contaminadas. Até 11 de Julho de 2022 foram confirmados pela OMS 552.504.629 casos de COVID-19 no mundo, incluindo

6.347.816 mortes. Só no Brasil, foram confirmados 32.687.680 casos e 672.790 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

É urgente, então, o desenvolvimento de um tratamento para pacientes sintomáticos e que possam inibir a transmissão do vírus. As proteases virais têm se mostrado alvos interessantes para inibição da replicação de diversas famílias vírus, como *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae* e *Picornaviridae*. Por exemplo, compostos inibidores de proteases são altamente efetivos no tratamento de HIV e hepatite C (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Existem cerca de 29 proteínas na estrutura do SARS-CoV-2, mas as principais são a proteína S (glicoproteína de pico ou proteína spike) e a proteína N, do nucleocapsídeo viral, que é responsável pelo processo de replicação do vírus. A proteína S é responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira através da ligação ao receptor celular proteico ACE2, é quando essas duas proteínas se ligam que o vírus consegue invadir a célula hospedeira (UZUNIAN, 2020). A membrana do vírus é composta pela proteína S, a proteína de membrana M e pela proteína hidrofóbica, chamada de proteína do envelope E, que envolve a estrutura do vírus (PAUL et al., 2021). A estrutura do vírus está representada na figura abaixo.

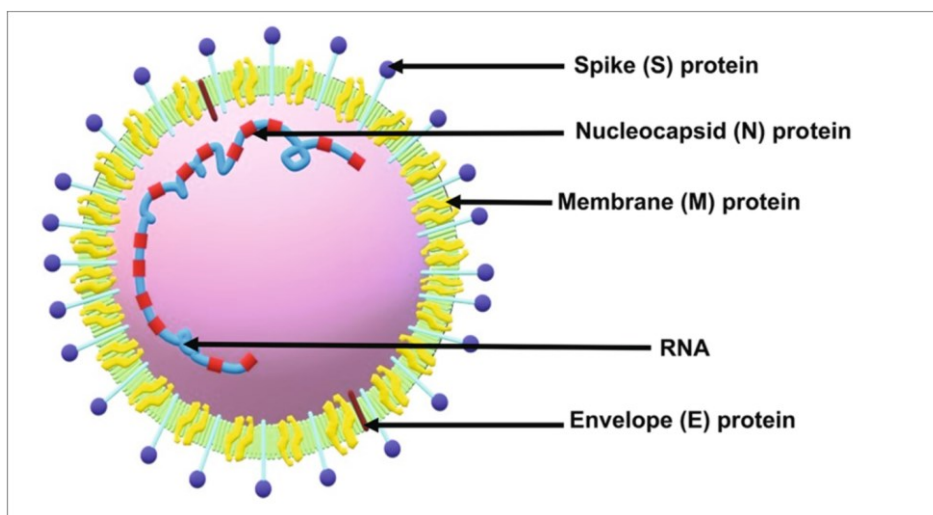


Figura 6: Estrutura do vírus SARS-CoV-2. (Retirado de: A. Paul et al.)

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de cadeia positiva e expressam longas poliproteínas, pp1a e pp1ab, que são processadas por duas proteases: a protease principal, quimiotripsina-like, M^{PRO} (também chamada 3CL^{PRO}) e a protease papaína-like, PL^{PRO}. Dezesesseis proteínas não estruturais maduras (NSPs) surgem do

processamento das poliproteínas. A PL^{PRO} cliva a poliproteína em 3 locais na porção do terminal N, enquanto a M^{PRO} faz clivagem em 11 locais das poliproteínas no terminal C (BHOWMIK et al., 2021). Essas NSPs participam de diferentes funções virais, incluindo a formação do complexo *replicase transcriptase*, que replica o RNA do genoma viral. Devido esse papel importante, as proteases são consideradas alvos promissores para drogas no tratamento da doença (MICHELON, 2020; WELKER et al., 2021).

As proteases M^{PRO} e PL^{PRO} possuem resíduos de cisteína, que atuam como nucleófilos, e histidina, que pode agir como ácido-base. Como explicado antes, as porções tióis são passíveis de S-nitrosilação e resíduos de cisteína também são abundantes no envelope viral do SARS-CoV-2, o que o mantém estruturado através da formação de pontes dissulfeto que favorecem a interação com células saudáveis e a transferência do material RNA viral (GHOSH et al., 2007; GONÇALVES et al., 2020).

Na figura 3 pode-se ver uma cadeia única da estrutura cristalina da protease principal M^{PRO} do coronavírus indicando os sítios ativos de resíduos catalíticos, Cys145 e His41 (DAS et al., 2021).

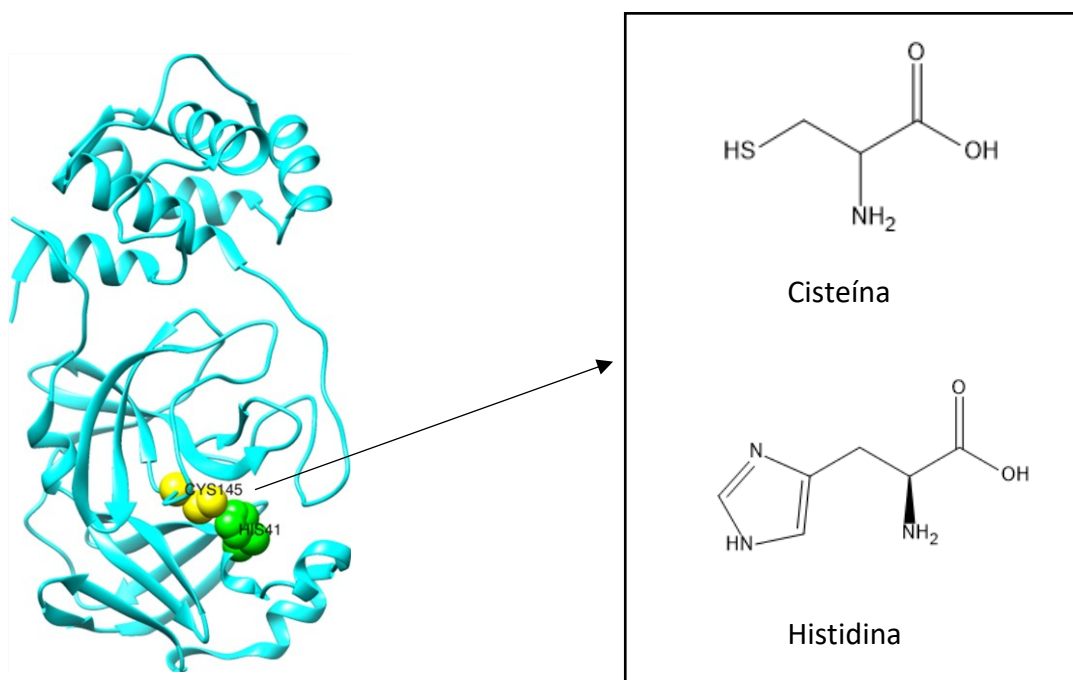


Figura 7: Estrutura cristalina de uma única cadeia da M^{PRO} destacando os resíduos de cisteína e histidina. (Retirado de DAS et al., 2021)

O FDA (Food and Drug Administration) autorizou o uso emergencial do PAXLOVID, produzido pelo laboratório Pfizer, para o tratamento de COVID-19, em casos de leve a moderados. A administração foi autorizada em pacientes maiores de 12 anos, com pelo menos 40 kg e em quem a doença esteja progredindo rapidamente incluindo hospitalização e risco de morte. Trata-se de um medicamento ainda em estudo, existem informações limitadas a respeito da eficácia e segurança no tratamento de pacientes com COVID-19 (PFIZER, 2022).

A composição do medicamento conta com Nirmatrelvir, um inibidor da protease principal do vírus SARS-CoV-2, a MPRO, e com Ritonavir, inibidor da protease do HIV-1 e do CYP3A (isoenzima do citocromo P-450, sua presença no intestino delgado diminui a biodisponibilidade de muitos medicamentos ingeridos (SHANNON; BORRON; BURNS, 2007)). Devido ao uso do ritonavir, existe o risco do desenvolvimento de resistência aos inibidores do HIV em pacientes infectados (FDA, 2022).

O nirmatrelvir é um inibidor peptidomimético (pequena cadeia parecida com proteína feita para imitar um peptídeo) da MPRO, a inibição dessa protease impede o processamento das poliproteínas responsáveis pela replicação viral. Segundo o FDA, em um estudo bioquímico realizado, o composto teve um KI de 3,1 nM (KI é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a enzima) e valor de IC50 de 19,2 nM (concentração necessária do fármaco para 50% de inibição). Foi verificado por cristalografia de raio-x que o nirmatrelvir se liga diretamente ao sítio ativo da protease MPRO. O ritonavir não é ativo contra a protease do SARS-CoV-2, sua função é impedir o metabolismo do nirmatrelvir mediado pela isoenzima do citocromo P-45, CYP3A, resultando em concentrações plasmáticas maiores do nirmatrelvir (FDA, 2022)

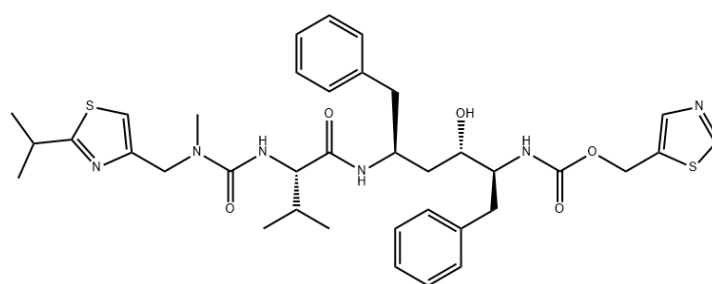
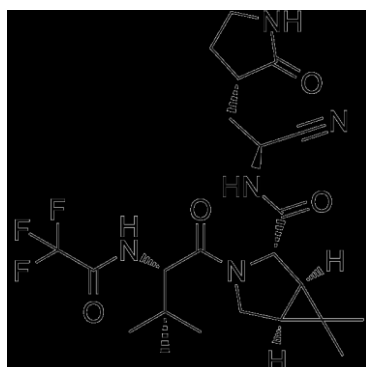


Figura 8: estrutura do nirmatrelvir (à esquerda) e do ritonavir (à direita) (retirado de MedChemExpress e ChemicalBook)

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo desse trabalho é fazer uma revisão na literatura dos principais doadores de óxido nítrico (NO) e como é sua ação no organismo, assim como sobre as estruturas e as reações que são suscetíveis. Também é abordado nesse trabalho como a modificação no sítio de cisteína das proteases virais a partir da reação de S-nitrosilação afetam a replicação no hospedeiro e como isso pode ser aplicado na protease principal do SARS-CoV-2, a M^{PRO}, como potencial tratamento da doença COVID-19. Para complementar a pesquisa também foi acrescentado quais são os benefícios do uso de NO no tratamento da doença além da reação de S-nitrosilação com os resíduos de cisteína.

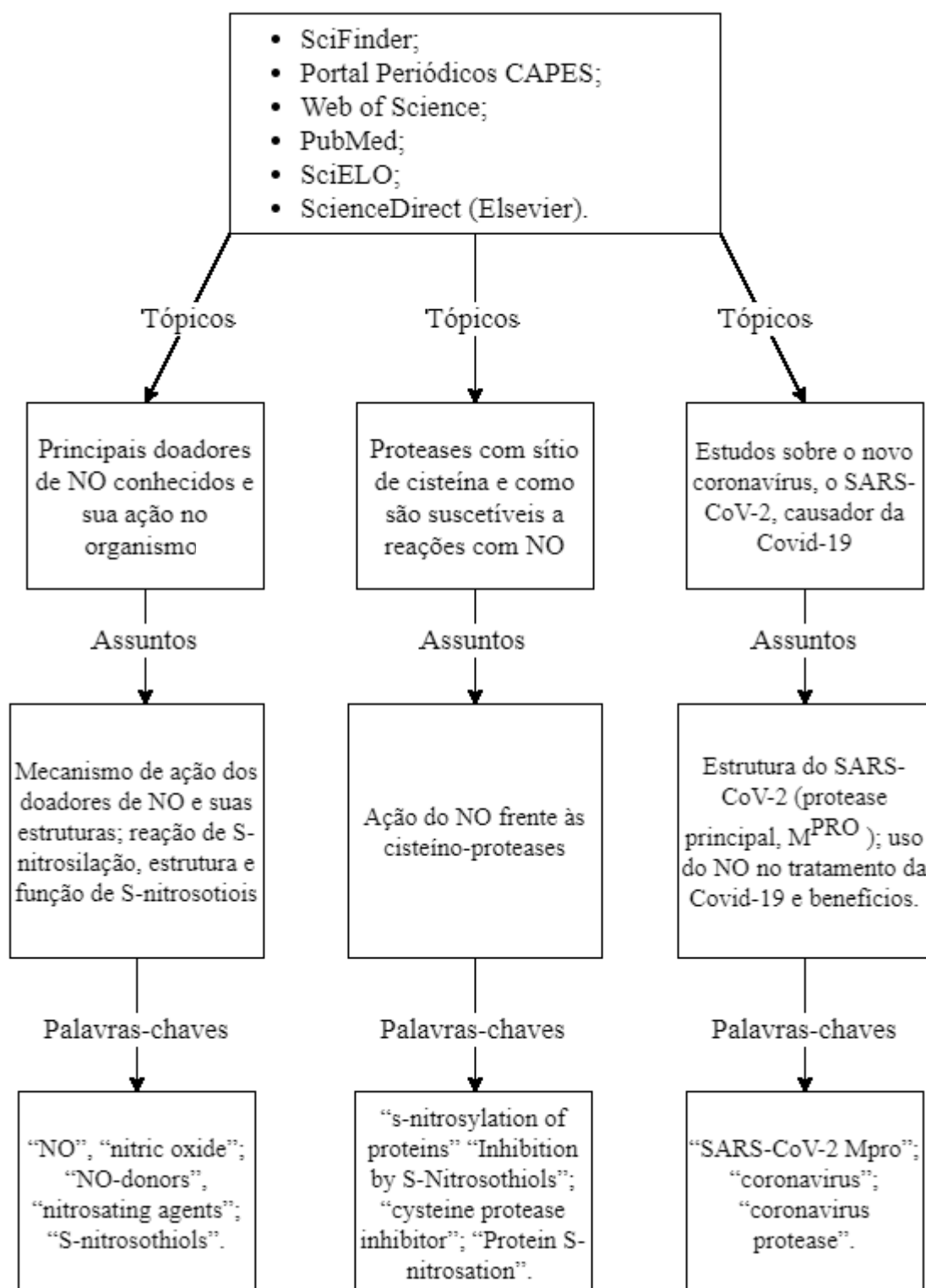
Pretende-se, com este estudo, propor futuramente o desenho de S-nitrosotióis de estruturas similares, visando a potencial inibição da protease viral através de reação de S-nitrosilação.

3. METODOLOGIA

Essa revisão da literatura foi realizada com base em artigos científicos publicados entre os anos de 2000 e 2022, com o objetivo de buscar doadores de óxido nítrico e qual a atividade do NO em reações de S-nitrosilação. A modificação de proteases pode alterar a atividade dos vírus levando a sua inativação. Também foi revisado o uso de doadores de NO como possíveis inibidores do novo coronavírus, SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19.

O fluxograma abaixo representa como foi o processo de seleção dos artigos para essa revisão bibliográfica, quais os principais tópicos e os principais tópicos de cada um. Também está demonstrado as palavras-chaves usadas nas pesquisas de cada passo.

Bancos de dados usados



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Doadores de NO

O uso terapêutico de NO gasoso é muito limitado, pois NO gasoso tem um período de meia-vida muito curto *in vivo*, difunde muito rápido e dificilmente se acumula nas células alvos (YANG; HUANG; LI, 2021). Portanto componentes capazes de doar NO são usados como agentes terapêuticos e farmacológicos (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002).

4.1.1 Nitratos orgânicos

Os nitratos orgânicos compõem a mais antiga classe de doadores de NO utilizada. São genericamente representados como RONO_2 e são ésteres derivados de álcoois. Os componentes mais conhecidos são a nitroglicerina e tetranitrato de pentaeritrina (Figura 5) (WANG et al., 2002).

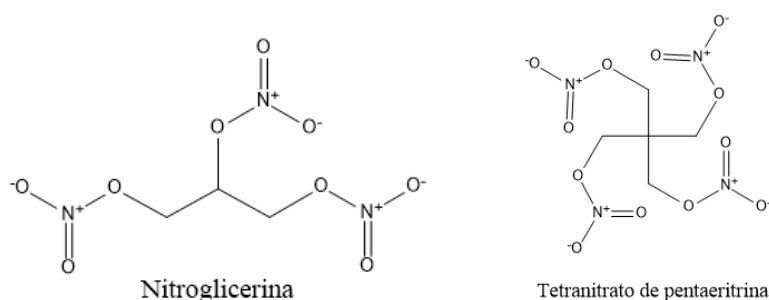


Figura 9: estruturas da nitroglicerina e do tetranitrato de pentaeritrina.

Os fármacos desse tipo são rapidamente absorvidos oralmente. Os nitratos orgânicos precisam ser biologicamente ativados para liberar NO por vias enzimáticas ou não-enzimáticas. A primeira via depende da atividade da enzima aldeído desidrogenase, que converte em nitrito e metabólito desnitrado. E as vias não-enzimáticas dependem da reação com o grupo tiol de cisteína e seus derivados ou com ascorbato, que promove a liberação de NO. Nessa via, grupos sulfidrilagem como redutores e formam seus respectivos dissulfetos (RSSR) e o ânion NO_2^- é liberado como principal metabólito nitrogenado. A cisteína e a *N*-acetil-cisteína são

capazes de liberar concomitantemente o radical $\text{NO}^\bullet$ (FRANÇA-SILVA et al., 2014; WANG et al., 2002).

4.1.2 Diazenodiolatos: NONOates

Os diazenodiolatos são interessantes pela sua habilidade de liberar NO em meios neutros (RANGEL-GALVÁN et al., 2019). Eles possuem a fórmula geral $\text{X}^-[\text{N}(\text{O})\text{NO}]$, que pode ser visto como um complexo de bases de Lewis (X^-) com um ácido de Lewis (N_2O_2 , que é um dímero de NO). A estrutura do dímero de NO, mostrado na Figura 6, explica a estabilidade do composto todo.

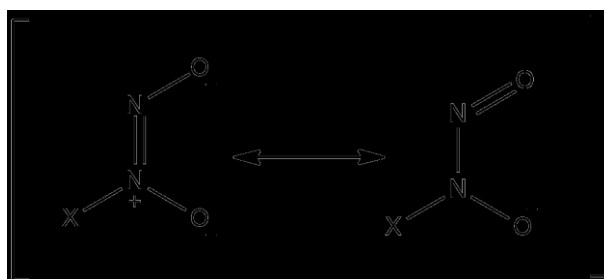


Figura 10: A forma aniônica existe em ressonância (retirado de: Rivera-Tirado, *et al.*)

A ligação N-N pertencente à parte ONNO é muito fraca, mas a adição de um par de elétrons aumenta drasticamente a estabilidade do íon resultante ONNO^- . Esse par de elétrons pode ser oriundo da porção X^- . Geralmente, trata-se de um carbânion ou ânion amida, mas também é conhecido com $\text{X} = \text{O}^{2-}$ (Sais de Angelis) (SHAIKH; VALIEV; LYMAR, 2014).

A forma mais conhecida e utilizada de diazenodiolatos é composto com grupos aminas, onde $\text{X} = \text{R}_1\text{R}_2\text{N}^-$, e podem liberar NO em meios neutros. Alguns exemplos são apresentados na Figura 7 (SHAIKH; VALIEV; LYMAR, 2014).

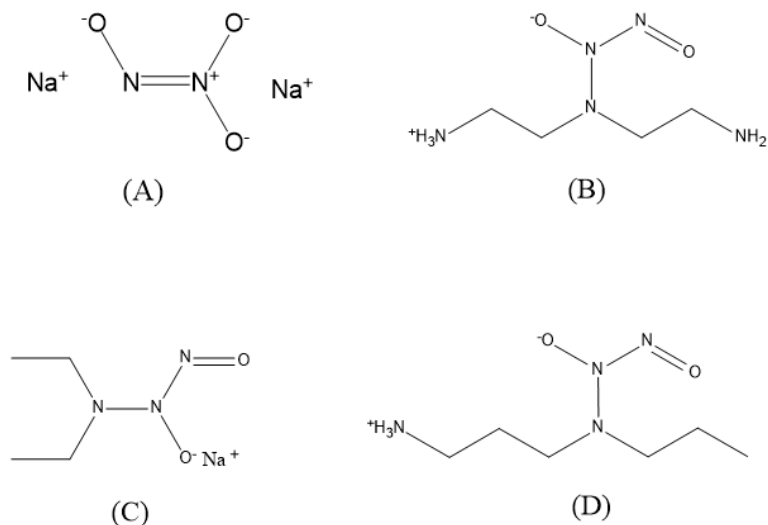


Figura 11: Exemplos de NONOates: (A) Sal de Angelis; (B) DEA NONOate; (C) DETA NONOate; (D) PAPA NONOate. (Retirado e adaptado de Shaik, *et al*)

A decomposição dos diazenodiolatos pode ser ocasionada por fotoexcitação ou adição de um aceptor de par de elétrons, como um próton (H^+). Porém, o mecanismo molecular dessas reações ainda não foi elucidado (RIVERA-TIRADO; LÓPEZ-CASILLAS; WESDEMIOTIS, 2011; SHAIKH; VALIEV; LYMAR, 2014). Miranda et al, estudou o mecanismo de decomposição em situações anaeróbicas e os cálculos quânticos suportam a ideia de que para a decomposição do sal ocorre a protonação do di-ânion, seguida de tautomerização e clivagem heterolítica da ligação N-N para produzir HNO e nitrito, como na figura abaixo (MIRANDA et al., 2005):

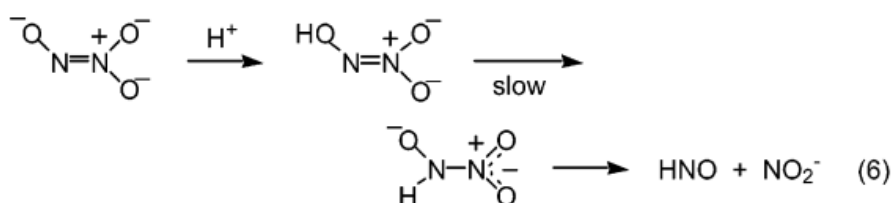


Figura 12: Decomposição do Sal de Angelis (retirado de Miranda, *et al*).

Os *N*-diazenodiolatos têm a vantagem de liberar NO e o correspondente grupo amino em meios neutros, à temperatura ambiente, como mostrado na Figura 9 (FITZHUGH; KEEFER, 2000).

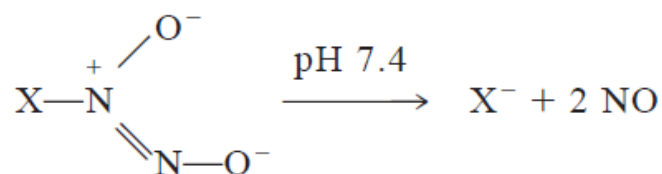
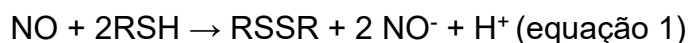


Figura 13: Decomposição de *N*-diazenodiolatos a pH neutro, onde X= grupo amino (retirado de: Fitzhugh, *et al.*)

Essa reação possui uma boa taxa de reprodutibilidade e um rendimento de NO alto, mantendo o pH constante e acontece espontaneamente. Esses compostos também têm a vantagem de uma meia vida alta: DEA NONOate de 2min; PAPA NONOate de 15 min; e DETA NONOate de 20h. Os demais diazenodiolatos, como o sal de Angelis, são uma boa fonte de íons como NO₂⁻, NO⁻, NO₂, NO⁺ etc (FITZHUGH; KEEFER, 2000).

4.1.3 S-nitrosotióis

A reação de S-nitrosilação de grupos tiois é amplamente debatido e não tem um mecanismo esclarecido. Tal formação não é tão simples, pois a reação direta entre um óxido nítrico e um tiol é extremamente lenta, o que resulta na formação de um dissulfeto e ânion NO⁻ (equação 1).



Como NO não é capaz de oxidar diretamente o grupo tiol, na presença de oxigênio o óxido nítrico é oxidado a N₂O₃, que é um bom agente nitrosilante (equação 2) (WOLHUTER; EATON, 2017). Em situações *in vivo* é possível que as membranas aumentem o rendimento da nitrosilação do grupo tiol, pois a reação entre óxido nítrico e oxigênio é mais rápida em meios hidrofóbicos (lipídeos, proteínas etc) (FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003; HOGG, 2002; WOLHUTER; EATON, 2017).

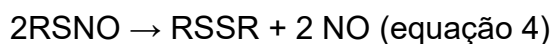


S-nitrosotióis podem ser sintetizados em laboratório a partir da reação entre tióis e ácido nitroso (equação 3). Essa rota é mais adequada para tióis de baixo peso molecular, como a S-NO-cisteína e a S-NO-glutathione. Não é recomendada para proteínas, pois o meio ácido causa desnaturação, essa reação necessita de um meio ácido, com pH < 3 (HOGG, 2002).

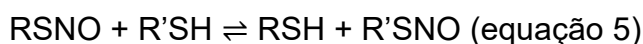


Os compostos RSNOs agem através do ataque nucleofílico do tiol, tanto no átomo de Nitrogênio quanto no Enxofre do grupo –SNO. O ataque ao N leva a transnitrosilação pela troca de NO^+ e o ataque ao S resulta na formação de uma ponte dissulfeto e HNO. A primeira reação é majoritária (RICHARDSON; BENJAMIN, 2002).

Os S-nitrosotióis podem ser decompostos por calor, luz UV, em pH < 2 e liberam NO e o dissulfeto correspondente como mostrado abaixo (equação 4). (RICHARDSON; BENJAMIN, 2002).



A transnitrosilação ocorre através de um ataque nucleofílico do ânion tiolato (RS^-) ao nitrogênio do S-nitrosotiol. Os produtos obtidos são um tiol e um RSNO, como descrito abaixo (equação 5) (RICHARDSON; BENJAMIN, 2002).



REAÇÃO DE TRANSNITROSILAÇÃO

Esse tipo de reação se mostrou uma maneira efetiva de transferir radicais $\text{NO}^\bullet$ entre espécies dentro das células e controlar a atividade de proteínas (AL-SA'DONI; FERRO, 2012; RICHARDSON; BENJAMIN, 2002).

Os S-nitrosotióis de baixo peso molecular, como os derivados de cisteína e glutathione, agem como doadores de NO para outras proteínas celulares sob condições fisiológicas (NAKAMURA; LIPTON, 2013).

4.1.3.1 Estrutura e estabilidade dos S-nitrosotiois

Os S-nitrosotiois (RSNO) podem se diferenciar dependendo dos substituintes do carbono- α em relação ao enxofre: o SNAP é terciário e o NACNO é primário. Os primários e secundários favorecem a conformação *cis*, e os terciários, a conformação *trans* em relação ao grupo RS-NO. Alguns exemplos que valem ser mencionados são: S-nitrosoglutationa (GSNO), S-nitrosoacetilpenicilamina (SNAP) e S-nitrosoacetilcisteína (NACNO) e estão apresentados na Figura 10. (MEYER et al., 2016).

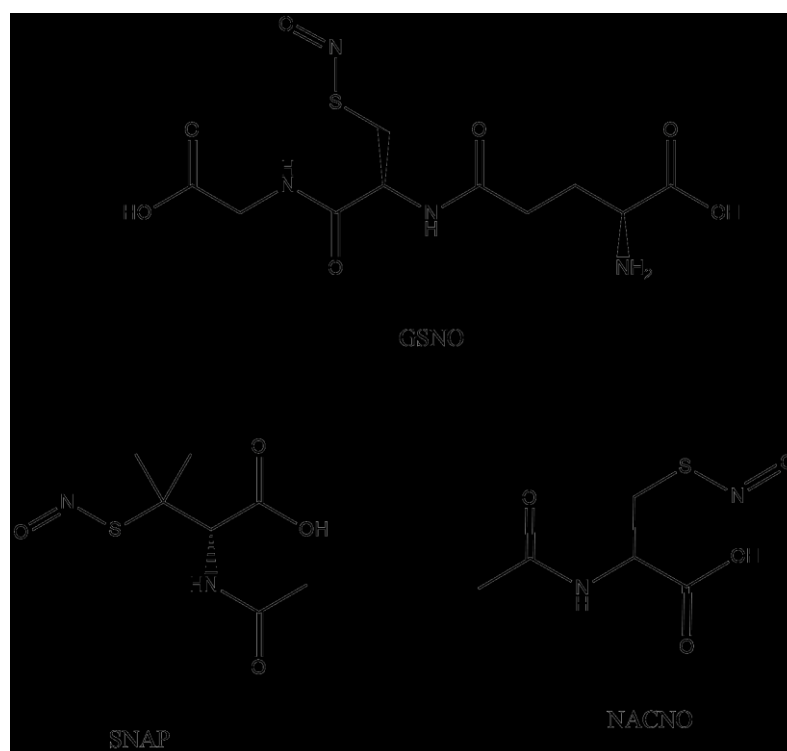


Figura 14: Estruturas de S-nitrosotiois: GSNO, SNAP e NACNO (Fonte autoral).

A estabilidade desses compostos depende de suas estruturas. Os RSNO geralmente exibem um caráter de ligação dupla S-N considerável, e apresentam duas conformações, *cis* e *trans*, que estão representados na Figura 11. A ligação S-N é alongada (1.8 Å), fraca (energia de dissociação: 25-30 kcal/mol) e a rotação em torno dessa ligação não é livre (existe uma barreira de rotação ≥ 10 kcal/mol) (TIMERGHAZIN; PESLHERBE; ENGLISH, 2007). O fato da ligação S-N ser

fraca é o que permite a liberação do radical NO• (TIMERGHAZIN; PESLHERBE; ENGLISH, 2008).

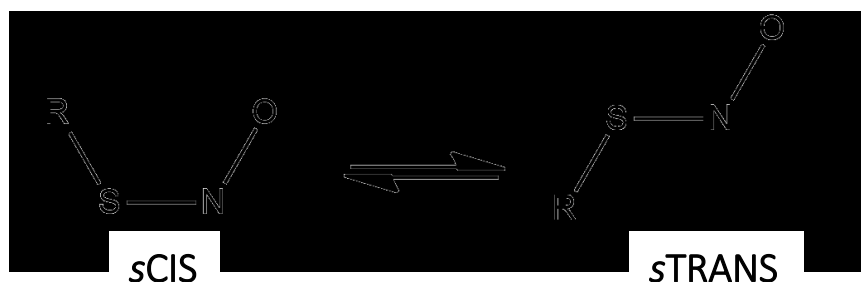


Figura 15: Estruturas sCis e sTrans de S-nitrosotióis (Retirado de Timerghazin, *et al.*)

A forma planar da estrutura sugere uma ligação dupla entre S e N. Timerghazin *et al*, propôs a estrutura eletrônica dos RSNOs como uma combinação de três híbridos de ressonância (figura 12).

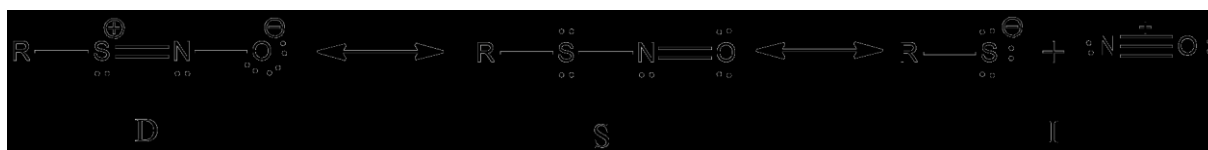


Figura 16: S é referente a estrutura neutra; D, zwitteriônico, a dupla ligação S=N; e I, ao par iônico que existe devido a fraqueza da ligação S-N (retirado de Timerghazin *et al*).

4.2 Inibição da atividade de proteínas por S-nitrosilação

A atividade de uma proteína com grupo tiol pode ser regulada com a reação de S-nitrosilação. Por exemplo, cisteíno-proteases possuem resíduos de grupo tiol que podem reagir reversivelmente com NO e formar uma ligação S-NO. Essa reação regula a atividade da proteína alostericamente ou por modificação direta do sítio ativo da proteína. A modificação covalente no sítio ativo da protease leva à sua inativação (NAKAMURA; LIPTON, 2013; XIAN *et al.*, 2000).

A transnitrosilação entre proteínas, geralmente, ocorre quando duas proteínas estão interagindo diretamente e possuem o potencial redox apropriado para permitir a troca de elétrons. A proteína com maior potencial de redução recebe os elétrons e perde a porção NO e a proteína com menor potencial de redução contendo uma

porção tiol livre é S-nitrosilada, levando a formação de novas proteínas S-nitrosiladas que regulam as vias de sinalização (NAKAMURA; LIPTON, 2013).

Uma condição que favorece a reação de S-nitrosilação, por exemplo, é por formação do anion tiolato (RS^-), que é mais suscetível à oxidação. Vizinhanças com pKa baixos também facilitam a reação. A parte hidrofóbica das proteínas podem concentrar NO e O_2 e, portanto, facilitam a formação de agentes S-nitrosilantes. (ASTIER et al., 2011; HESS et al., 2001; NAKAMURA; LIPTON, 2013).

A regulação reversível da função da proteína por S-nitrosilação levou à proposta de que os S-nitrosotióis funcionam como modificações pós-traducionais, análogas às criadas por fosforilação ou acetilação. Trata-se de uma reação reversível pois a ligação S-NO formada é muito lábil e sensível a mudança redox e, então, essa ligação pode ser desfeita na presença de um agente redutor como, por exemplo, o GSH, ascorbato e íons metálicos (ASTIER et al., 2011).

4.3 SARS-CoV-2: estrutura e protease

O vírus da SARS-CoV-2 é da família SARS, sigla que vem do inglês e significa Síndrome Respiratória Aguda Grave. Os coronavírus são vírus de RNA e podem ser divididos em 4 gêneros: alpha-coronavírus, beta-coronavírus, gama-coronavírus e delta-coronavírus. O vírus SARS-CoV-2 pertence ao gênero beta-coronavírus. Novos tipos de coronavírus podem surgir periodicamente em humanos, devido a ampla distribuição dos vírus, a diversidade genética e recombinação frequente (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020; WU et al., 2020).

O genoma viral trata-se de um RNA positivo de fita simples, com cerca de 30.000 nucleotídeos e tem 82% de similaridade com o vírus SARS-CoV. Os beta-coronavírus possuem em seu genoma a proteína estrutural Spike (S), que é responsável pela fixação do vírus na célula hospedeira e induz o sistema imune do hospedeiro, e proteínas não estruturais (BANERJEE; PERERA; TILLEKERATNE, 2021). A sequência do genoma revelou a presença da protease 3 CL^{PRO}, ou SARS-CoV 3 CL^{PRO}, ou M^{PRO}. O sítio ativo da protease é composto pela His41 e Cys145, que é muito semelhante ao arranjo encontrado em outros coronavírus (BACHA et al., 2004; NOSKE et al., 2021).

A principal protease do novo coronavírus é responsável pela maturação das poliproteínas pp1a e pp1ab, que são responsáveis pela replicação viral e transcrição,

em até 11 sítios, que são responsáveis pela atividade e dimerização. Para entrar nas células hospedeiras, o coronavírus primeiro se liga a um receptor na superfície da célula, entram nos endossomos e eventualmente fundem as membranas virais e lisossômicas (SHANG et al., 2020). Noske e colaboradores (2021) descreveu o mecanismo molecular pelo qual a protease 3 CL^{PRO} se autoprocessa, tornando-se ativa para replicar o RNA dentro da célula hospedeira. O grupo chegou à conclusão que a protease precisa ser dimérica, isso significa que é necessário um par de cópias da protease para que ela possa cortar a si mesma e as outras proteínas responsáveis pelo metabolismo do vírus (NOSKE et al., 2021). Enzimas essenciais para replicação, como a polimerase de RNA RNA-dependente (RdRp) e a NTPase/helicase (nsp13), não funcionam sem liberação proteolítica prévia, portanto a protease M^{PRO} é uma enzima chave no ciclo de replicação viral. A sua inibição pode impedir a produção de partículas virais infecciosas e alivia os sintomas da doença causada pelo vírus. (ULLRICH; NITSCHKE, 2020).

4.4 A replicação do SARS-CoV-2

A glicoproteína S (spike ou proteína S) é desempenha papel fundamental no ciclo de reprodução do vírus na célula hospedeira. Essa proteína é ligada a célula através da Enzima Conversora de Angiotensina II (ACE2), que é abundante nos pulmões, por isso o aparecimento dos sintomas respiratórios. Para essa ligação, é preciso de uma serina protease chamada TMPRSS2, que cliva e ativa a proteína S e promove a ligação ao ACE2. Após a ligação, ocorre uma modificação no formato da proteína que permite a fusão do vírus na membrana celular ou endossomática (MERCÊS et al., 2020; UZUNIAN, 2020).

Após o RNA ser depositado na célula hospedeira ocorre a tradução dos genes ORF1a e ORF1b, que são responsáveis pela produção das replicases virais poliproteínas pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são processadas em proteínas não estruturais que formam o complexo de replicação e transcrição viral. Esses NSPs participam de diferentes funções virais, incluindo a formação do complexo replicase-transcriptase. As proteínas estruturais traduzidas são deslocadas para as membranas do retículo endoplasmático e transitam através do compartimento intermediário do retículo para o complexo de Golgi. A parte genômica restante do vírus codifica o

mRNA que produz as proteínas estruturais. Por fim, os vírus replicados são expelidos da célula por meio de excitose (V'KOVSKI et al., 2021).

4.5 Inibição da protease principal do SARS-CoV-2

Já é conhecido que as proteases virais são alvos de medicamentos. Por exemplo, o vírus da Imunodeficiência Humana tem uma aspartil-protease em sua estrutura, e o vírus da Hepatite C possui uma serino-protease. Ambas são alvos dos fármacos que compõem o tratamento (ULLRICH; NITSCHKE, 2020).

Diversas pesquisas já foram realizadas visando o desenvolvimento de um medicamento que tenha como alvo a protease do novo coronavírus. Para atingir uma ligação covalente entre o inibidor e o sítio catalítico cisteína da protease, diversos tipos de inibidores peptídicos foram sintetizados com diferentes grupos funcionais eletrofílicos, como halometilcetonas, epoxicetonas e nitrilas. Todos esses grupos inibiram a replicação do vírus com sucesso. Jin et al observou que adição de Michael no sítio catalítico Cys145 ao inibidor, resultou numa inibição irreversível (BANERJEE; PERERA; TILLEKERATNE, 2021).

Diversos grupos de pesquisa estão chegando em resultados favoráveis em relação a inibição da protease principal do novo coronavírus e de como evitar sua replicação viral nas células dos hospedeiros.

4.6 O NO no tratamento de Covid-19: uso e benefícios

A doença da Covid-19 também está associada a “tempestade de citocinas”, que é uma superprodução das interleucinas IL-1B, IL-2, IL-6, IL-8, IFN α/β , fator de necrose alfa (TNF- α), quimiocina CC dos tipos CCL3, CCL5 e CCL2. (BEN MOFTAH; ESWAYAH, 2022; ORONSKY et al., 2020; SAFAEE FAKHR et al., 2021). Outro biomarcador importante para o prognóstico da Covid-19 é o aumento no nível de D-dímeros, que está relacionado a eventos trombóticos em pacientes hospitalizados, que é formado a partir de fibrinas (BEN MOFTAH; ESWAYAH, 2022). Outra consequência dessa doença é a disfunção endotelial, levando a diminuição de NO endógeno, que resulta em respostas vasoconstritoras, inabilidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio e maiores danos endoteliais (BEN MOFTAH; ESWAYAH, 2022).

Oronsky e colaboradores (2020) estudaram o uso de RRx-001 (N-bromoacetil-3,3-dinitroazetidina) no tratamento da Covid-19. Trata-se de uma molécula doadora de NO que se acopla as hemácias e media as funções protetoras, antitumorais e antipatogênicas da molécula. E

Em outros estudos já foi mostrado sua atividade contra malária, ebola, tuberculose e leishmaniose.

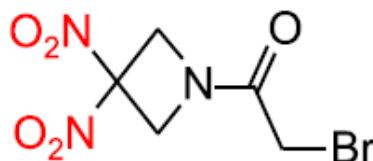


Figura 17: Molécula do RRx-001, doador de NO (retirado de Oronsky, *et al.*)

O grupo se baseou nas evidências de que a molécula em questão tem potencial para aliviar doenças no pulmão, como pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), o que levou ao interesse em utilizar esse fármaco para tratar os sintomas pulmonares causados pela Covid-19, que vão desde infecção no trato respiratório superior até pneumonia hipoxêmica. O RRx-001 se liga ao resíduo da hemoglobina chamado beta-cisteína 93, que aumenta a conversão enzimática de nitrito em NO e leva a sua superprodução e liberação sob condições hipóxicas. Essa produção de NO é seletivamente direcionada a tecidos isquêmicos. Outra função de interesse dessa molécula é a habilidade de ativar a Nrf2 (fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2), que é um regulador de resposta antioxidativa e induz genes que reduzem espécies reativas de oxigênio. O NO também trabalha para inibir a NF-kB (fator nuclear kappa-B), um fator de transcrição, e esses tipos de proteínas coordenam onde e como os genes serão transcritos. A NF-kB é um heterodímero que produz citocinas pró-inflamatória e enzimas como IL-1B, TNF- α , COX-2, IL-6 e induz lesão pulmonar. Portanto, a RRx-001 ajuda a proteger a parênquima pulmonar induzindo o Nrf2. O uso dessa molécula foi avaliado e bem aceito num estudo feito com mais de 300 pacientes com câncer (ORONSKY *et al.*, 2020).

A hidroxíureia (HU) tem capacidade de sofrer conversão *in vivo* e liberar NO, além de estimular a produção de hemoglobina fetal (HbF) (Figura 14). A administração de NO em pacientes mostrou benefícios pulmonares e cardiovasculares, além do

óxido nítrico atuar na inibição da replicação do SARS-CoV-2. A hidroxiureia é um medicamento bem tolerado, sem registros de dano crônico aos órgãos, tem excelente biodisponibilidade oral e volume de distribuição. O metabolismo dessa molécula é hepático e renal, sendo um dos produtos final do mecanismo de eliminação a ureia.

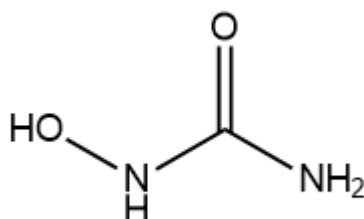


Figura 18: Fórmula estrutural da Hidroxíureia. (Fonte autoral)

Um estudo clínico em pacientes que sofriam de anemia falciforme mostrou que a administração de HU proporcionou um aumento na produção de HbF causado por um aumento de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Esses altos níveis de cGMP são estimulados pela geração de NO no organismo e pela ativação da proteína quinase que induz a produção de HbF. O efeito antiviral de HU foi mostrado no tratamento da hepatite C e, portanto, tem potencial para o tratamento também de doenças causadas por vírus de RNA. Também já foi constatado que pacientes com Talassemia que foram tratados com HU, tiveram uma grande diminuição nos níveis de dímero D, tendo potencial para proteção contra eventos trombóticos. Assim, concluiu-se que o fármaco poderia ter o mesmo efeito no tratamento da Covid-19 (BEN MOFTAH; ESWAYAH, 2022).

O composto furoxano (1,2,5-oxadiol-2-óxido) e seus derivados são capazes de liberar NO na presença de tióis, assim como sob ação enzimática em tecidos de processo complexo que envolvem mais que redução para formação de NO (Figura 15) (AL-SEHEMI et al., 2020).

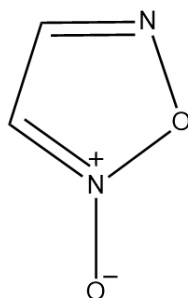


Figura 19: Estrutura do núcleo do furoxano. (Fonte autoral).

Vários compostos são estudados para o bloqueio da ação da ACE2, que é o alvo terapêutico de novas drogas em estudos *in silico*. Os estudos abrangem simulação computacional, onde é analisada a energia de afinidade da protease principal do SARS-CoV-2 M^{PRO} com potenciais inibidores no cálculo da energia livre. E também é investigado as propriedades estruturais e mudanças na conformação da M^{PRO} e padrão de interação vírus-membrana e vírus-inibidor. E por fim, são monitoradas as propriedades termodinâmicas da interação dos derivados de furoxano com o vírus da SARS-CoV-2 na presença e ausência de inibidores antivirais. Com essas informações é possível desenvolver ou até mesmo usar drogas já existentes para o tratamento da Covid-19. Al-Sehemi *et al* (2020) focou seus estudos no uso de furoxanos como possíveis fármacos que tem como alvo a protease do SARS-CoV-2, usando docagem molecular. O grupo utilizou 28 estruturas diferentes de furoxano doadores de óxido nítrico acoplados com benzidril-piperazina e espiro-isoquinolino-piperidina, que são estruturas parecidas com peptídeos. A docagem indicou que o anel espiro-isoquinolino-piperidina é responsável pelo encaixe da molécula no sítio de ligação de modo que o resto da molécula fique perpendicular ao mesmo, que é a chave para a interação com a M^{PRO}. Os derivados de furoxano têm estrutura semelhante a peptídeos e podem ser comparados com a já conhecida carboxamida de imidazol, X77, para explorar o potencial de ligação com a M^{PRO}. Dentre todas as estruturas estudadas, os compostos **22** e **26**, foram os que tiveram melhor desempenho nas simulações por dinâmica celular, que comprovou a estabilidade da ligação de derivados de furoxano com a protease principal do SARS-CoV-2. (Figuras 16 e 17) Esses complexos foram comparados com um inibidor de M^{PRO} X77 (AL-SEHEMI *et al.*, 2020).

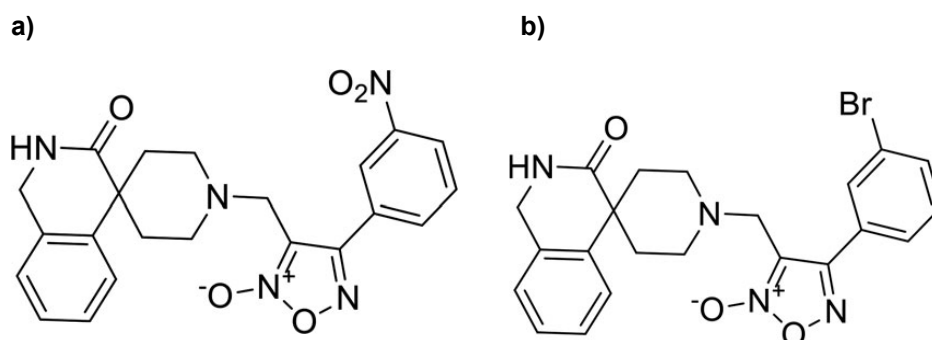


Figura 20: a) Composto 22; b) Compostos 26. (Retirado de AL-SEHEMI *et al.*)

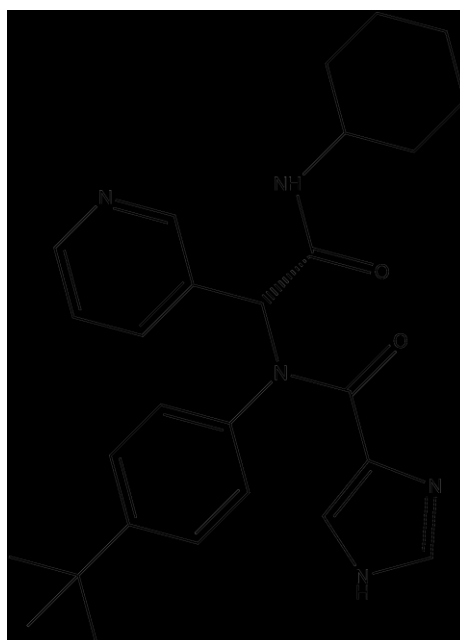


Figura 21: inibidor de MPRO carboxamida de imidazol, X77 (Fonte autoral)

O composto **22** tem energia de afinidade de -9,6 kcal/mol, com score da docagem de -90,93 e uma importante interação de hidrogênio com o resíduo de cisteína CYS145, SER144, HIS41 e HIS163. O composto **26** mostrou afinidade de ligação de -9,8 kcal/mol e score da docagem de -90,91 em comparação ao **22**. Os valores de RMSD para M^{PRO}-22 foi de 0,20 nm, para M^{PRO}-26, de 0,28 nm. O grupo controle desse estudo foi a interação da M^{PRO} com o antiviral X77, que teve RMSD de 0,18nm. Os resultados encontrados de RMSF indicam que o comportamento da M^{PRO} frente às moléculas **22** e **26** é igual ao grupo controle, M^{PRO}-X77. O sítio ativo de

resíduos da M^{PRO} interagindo com as moléculas **22** e **26** mostraram valores baixos de flutuação, indicando uma estável interação de hidrogênio com os aromáticos dos resíduos com os inibidores. Os estudos de MD estavam de acordo com o grupo controle, indicando potencial inibidor para as moléculas. Em relação a energia de ligação (DELTA G lig), o grupo controle teve um valor de -130,014 e para M^{PRO}-22, -183,860 e para M^{PRO}-26, de -171,972, então os derivados de furoxano se mostraram mais eficazes interagindo com a M^{PRO} que o inibidor X77. O grupo concluiu que a afinidade de ligação entre os derivados de furoxano e a M^{PRO} se mostrou mais eficaz que o inibidor conhecido X77. Isso indica que os derivados de furoxano têm potencial para agir contra o vírus da SARS-CoV-2 (AL-SEHEMI et al., 2020).

O NO gasoso para inalação é um vasodilatador pulmonar seletivo que foi aprovado pelo FDA em 1999 em tratamento de recém-nascidos com hipóxia respiratória devido a hipertensão pulmonar. Esse tratamento é utilizado para aumentar a oxigenação em pacientes ventilados mecanicamente que sofrem de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SARA) (PIERETTI et al., 2021; SAFAEE FAKHR et al., 2021). Inalação de NO foi testado em pacientes infectados com MERS-CoV e os resultados foram satisfatórios mostrando que o uso de NO para o tratamento é positivo e sem efeitos colaterais (PIERETTI et al., 2021)

Fakhr *et al* (2021) desenvolveu uma máscara facial para inalação do gás em pacientes que não foram intubados e então foi possível fornecer até 250 ppm de NO. Em outros estudos realizados em 2020 o grupo administrou 160-200 ppm de NO gasoso em pacientes com insuficiência respiratória aguda e em 6 grávidas em estado grave de pneumonia causado pela Covid 19. O NO inalado melhorou a oxigenação, reduziu a frequência respiratória e diminuiu os níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios (SAFAEE FAKHR et al., 2021).

Em 2021, o mesmo grupo realizou um ensaio clínico envolvendo paciente que tiveram infecção por SARS-CoV-2 confirmada por ensaio de rt-PCR e tiveram presença de sintomas de COVID-19 como tosse ou taquipneia, com uma frequência respiratória ≥ 24 respirações/minuto. Para o estudo, 160 ppm de NO gasoso foi administrado por 30 minutos, duas vezes por dia, durante 14 dias. Durante a aplicação do NO, pacientes que sofriam taquipneia tiveram a taxa de respiração diminuída, mostrando o papel do NO gasoso em aliviar doenças respiratórias. Na pesquisa os pacientes sofreram de infecção sistêmica com elevado nível de IL-6, proteína C reativa

e D-dímeros no plasma enquanto as contagens de células brancas estavam dentro da média normal. Os pacientes que foram tratados com NO gasoso não retornaram ao hospital após alta. Nenhum evento adverso foi observado após o tratamento e o grupo, então, concluiu que altas doses de NO inalado (160 ppm) podem ser seguramente administrados em pacientes com Covid-19 não-entubados (SAFAEE FAKHR et al., 2021).

Estudos indicam que a associação de doadores de NO com nanomateriais aumenta a estabilidade do NO e permite liberação controlada e direcionadas nas concentrações desejadas, que é essencial para a bioação do NO. Já foi estudado que o NO liberado pelas Oxido Nítrico Sintases (iNOS) inibe o ciclo de replicação do SARS-CoV. A associação de SNAP com CuNPs habilitou a liberação de NO do SNAP através da catalização com CuNPs. Um estudo clínico foi feito por 2 centros: Boston e Xi'na, onde foram administrados NO gasoso em duas situações: altas doses do gás, na concentração de 180 ppm por curto períodos de tempos, de 20 a 30 minutos, e baixa doses de gás, na concentração de 80 ppm durante 48h. O NO se mostrou com potencial alto para o tratamento de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 nas duas condições propostas, aumentando a oxigenação, o mecanismo antiviral e na prevenção do agravamento da doença (PIERETTI et al., 2021).

Existem outras formas de obter NO para o organismo pela ingestão de frutas e vegetais que estão presentes no consumo diário dos seres humanos e são ricos em nitratos, que podem ser convertidos em NO. Maçã tem propriedades anti-inflamatórias no pulmão humano e células epiteliais da traqueia, aliviando as citocinas pró-inflamatórias e a sinalização de quimiocinas. A uva protege o pulmão de lesões inibindo IL-8 e TNF- α , consequências da Covid-19. Frutas cítricas são ricas em vitamina C, que aumenta a biodisponibilidade de NO de outras fontes e inibe a ativação de NF-kB por IL-1, TNF- α e bloqueia a produção de IL-8. As laranjas possuem cerca de 0,8 mg de nitrato e 0,02 mg de nitrito. Cenouras e rabanetes são ricos em L-arginina, que é o precursor da produção de NO no organismo. Altas concentrações de nitrito e nitratos foram encontradas no espinafre (0,27 mg e 926 mg) (SWATHI KRISHNA; THENNAVAN; KANTHLAL, 2022).

Akaberi e colaboradores (2021) estudaram a mitigação da replicação do SARS-CoV-2 tratado com óxido nítrico *in vitro*. A metodologia utilizada pelo grupo contou com o uso de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e a versão não-nitrosilada, NAP.

Células Vero E6 foram inoculadas com 0,005 multiplicidade de infecção (MOI) de SARS-CoV-2. As células foram tratadas com 200 uM ou 400 uM de SNAP. Os experimentos foram feitos em triplicatas e foram analisados o desenvolvimento de efeitos citopáticos (ECP) e cinética de replicação viral, 72h após a infecção das células. O genoma viral foi quantificado por RT-qPCR. Os resultados encontrados pelo grupo mostraram que as células tratadas com SNAP tiveram uma redução do RNA viral do SARS-CoV-2, o que mostra o efeito inibitório que o óxido nítrico tem no vírus, enquanto o NAP não mostrou o mesmo efeito. Além disso, também foi feito um ensaio FRET para determinar se a inibição do vírus acontece a partir da reação de S-nitrosilação da cisteína que se encontra na M^{PRO}. Os resultados obtidos mostraram que a redução da fluorescência máxima detectada, juntamente com o perfil das curvas observadas nas reações enzimáticas onde o SNAP foi adicionado, foi consistente com a inibição covalente da protease (AKABERI et al., 2020).

A M^{PRO} é passível de inativação por outras moléculas, além do NO. Amporndanai, *et al* (2021) estudou a possibilidade de utilizar o organoseleneto Ebselen e seus derivados como inibidores da protease principal do SARS-CoV-2 (Figura 18). O grupo de pesquisa mostrou, cristalograficamente, que o composto Ebselen e o seu derivado, MR6-31-2, se ligam ao sítio catalítico da enzima M^{PRO} ao doar um átomo de selênio, formando uma ligação covalente e bloqueando a díade His-Cis catalítica. Seus dados de IC₅₀ e EC₅₀ mostram que esses compostos têm grande poder inibidor do SARS-CoV-2 e potencial para desenvolver fármacos para o tratamento da Covid-19 (AMPORNDANAI et al., 2021).

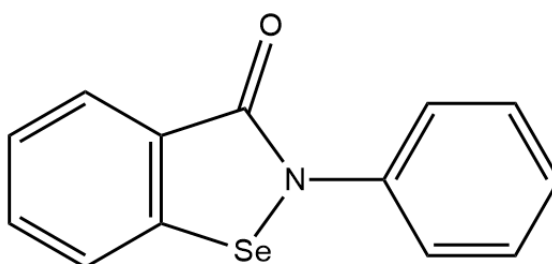


Figura 22: estrutura do Ebselen. (Fonte autoral)

5. CONCLUSÃO

Desde 2020 o mundo sofre com a pandemia da doença Covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2 e se fez importante a busca por um tratamento efetivo contra esse mal que causou milhares de mortes ao redor do globo. O SARS-CoV-2 faz parte da família de vírus de SARS-CoV, que já é bem conhecido, portanto pode-se utilizar o conhecimento já obtido desses vírus para o desenvolvimento de um fármaco para o tratamento da doença.

Usando como base a estrutura da protease principal, M^{PRO} , do vírus foi proposto o uso de óxido nítrico (NO) como potencial inibidor do vírus. Pelas pesquisas conclui-se que o NO tem potencial para inibir e diminuir replicação do vírus no hospedeiro, mas também pode-se acrescentar outros benefícios do uso de NO inalado no tratamento, como diminuição na superprodução de interleucinas, TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) e dímeros-D, que estão relacionados a eventos trombóticos. Além da melhora na taxa de respiração por ser um dilatador de brônquios.

Existem várias opções de fármacos que podem ser facilmente desenvolvidos com doadores de NO, sendo o mais interessante deles os S-nitrosotiois, que já é usado em tratamentos de outros vírus, por exemplo na inibição do HIV-protease. Portanto, o uso de NO no tratamento da Covid-19 é viável e já é objeto de estudo da comunidade científica que avança cada dia mais para encontrar um método terapêutico para cura dessa doença.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. Protease Inhibitors in the Clinic. **Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 71–104, 2006.
- AKABERI, D. et al. Mitigation of the replication of SARS-CoV-2 by nitric oxide in vitro. **Redox Biology**, v. 37, p. 101–734, 2020.
- AL-SA'DONI, H. H.; FERRO, A. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: Chemistry, Biology and Possible Future Therapeutic Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2679–2690, 2012.
- AL-SEHEMI, A. G. et al. Potential of NO donor furoxan as SARS-CoV-2 main protease (Mpro) inhibitors: in silico analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 15, p. 5804–5818, 2020.
- AMPORNDANAI, K. et al. Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–7, 2021.
- ASTIER, J. et al. S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 527–533, 2011.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Chemical Principles - The Quest For Insight**. 5th editio ed. [s.l.] Palgrave Uk, 2010.
- BACHA, U. et al. Identification of Novel Inhibitors of the SARS Coronavirus Main Protease 3CLpro. **Biochemistry**, v. 43, n. 17, p. 4906–4912, 2004.
- BANERJEE, R.; PERERA, L.; TILLEKERATNE, L. M. V. Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 3, p. 804–816, 2021.
- BARRETO, R. D. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Nitric oxide: Properties and therapeutic use. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046–1054, 2005.
- BEN MOFTAH, M.; ESWAYAH, A. Repurposing of Hydroxyurea Against COVID-19: A Promising Immunomodulatory Role. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 20, n. 1, p. 55–62, 2022.
- BHOWMIK, D. et al. "Identification of Nafamostat and VR23 as COVID-19 drug candidates by targeting 3CLpro and PLpro.". **Journal of Molecular Structure**, v. 1233, 2021.
- CARELLI, G. S. C. et al. Proteases and their inhibitors in coagulation and inflammation. **Tópicos multidisciplinares em ciências biológicas 3**, p. 6–16, 2020.
- DAS, S. et al. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. **Journal of Biomolecular**

Structure and Dynamics, v. 39, n. 9, p. 3347–3357, 2021.

DERAKHSHAN, B.; WILLE, P. C.; GROSS, S. S. Unbiased identification of cysteine s-nitrosylation sites on proteins. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1685–1691, 2007.

DUPONT, L. L. et al. Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 1–6, 2014.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

FDA. **Pfizer Paxlovid Fact Sheets for HCPs (07052022)**, 2022. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/155050/download>>

FERRO, A. S-Nitrosothiols as Nitric Oxide-Donors: Chemistry, Biology and Possible Future Therapeutic Applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2679–2690, 2012.

FITZHUGH, A. L.; KEEFER, L. K. Diazeniumdiolates: Pro- and antioxidant applications of the “NONOates”. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1463–1469, 2000.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FOSTER, M. W.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. A protein microarray-based analysis of S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 18948–18953, 2009.

FOSTER, M. W.; MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 160–168, 2003.

FRANÇA-SILVA, M. S. et al. Organic nitrates: Past, Present and Future. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15314–15323, 2014.

GHOSH, A. K. et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic SARS-CoV 3CLpro inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 21, p. 5876–5880, 2007.

GONÇALVES, S. Q. B. et al. Coronavírus E Sua Protease Principal: Uma Visão Para

O Planejamento De Fármacos Por Docagem Molecular. **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 1, p. 63–72, 2020.

HASÖKSÜZ, M.; KILIÇ, S.; SARAÇ, F. Coronaviruses and sars-cov-2. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 549–556, 2020.

HESS, D. T. et al. S-nitrosylation: Spectrum and specificity. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 2, p. 3–5, 2001.

HOGG, N. The Biochemistry and Physiology of S-Nitrosothiols. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 585–600, 2002.

HUERTA, S.; CHILKA, S.; BONAVIDA, B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (review). **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 5, p. 909–927, 2008.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. **Circulation Research**, v. 90, n. 1, p. 21–28, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. [s.l.] Grupo GEN, 2017.

MERCÊS, D. et al. Doença de coronavírus 2019 (covid-19): mecanismos, diagnóstico diferencial e influência das medidas de intervenção. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1–9, 2020.

MEYER, B. et al. Structure and Stability Studies of Pharmacologically Relevant S-Nitrosothiols: A Theoretical Approach. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 120, n. 24, p. 4191–4200, 2016.

MICHELON, P. D. C. M. **COVID-19 – Conhecendo o inimigo**. Disponível em: <<https://www.sbac.org.br/blog/2020/04/16/covid-19-conhecendo-o-inimigo/>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

MIERSCH, S.; MUTUS, B. Protein S-nitrosation: Biochemistry and characterization of protein thiol-NO interactions as cellular signals. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 777–791, 2005.

MIRANDA, K. M. et al. Mechanism of aerobic decomposition of Angeli's salt (Sodium Trioxodinitrate) at physiological pH. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 2, p. 722–731, 2005.

MIYAMOTO, Y. et al. Novel functions of human α 1-protease inhibitor after S-nitrosylation: Inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. **Biochemical**

and Biophysical Research Communications, v. 267, n. 3, p. 918–923, 2000.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 3, p. 239–249, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l.] Grupo A, 2019.

NOSKE, G. D. et al. A Crystallographic Snapshot of SARS-CoV-2 Main Protease Maturation Process: SARS-CoV-2 Mpro maturation. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 18, p. 167118, 2021.

ORONSKY, B. et al. Desperate Times, Desperate Measures: The Case for RRx-001 in the Treatment of COVID-19. **Seminars in Oncology**, v. 47, p. 305–308, 2020.

PAUL, A. et al. Synthetic and computational efforts towards the development of peptidomimetics and small-molecule SARS-CoV 3CLpro inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 46, n. June, p. 116301, 2021.

PFIZER. **PAXLOVID(TM)**. Disponível em:
<https://www.paxlovid.com/?source=google&HBX_PK=s_paxlovid+oral&skwid=43700068270576706&gclid=EAlaIQobChMI0uv6wev1-AIVTBTUAR1IBwJtEAAYASAAEgK3fvD_BwE&gclsrc=aw.ds>.

PIERETTI, J. C. et al. Nitric oxide (NO) and nanoparticles – Potential small tools for the war against COVID-19 and other human coronavirus infections. **Virus Research**, v. 291, p. 198–202, 2021.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 584–590, jul. 1999.

RANGEL-GALVÁN, V. et al. Effect of the alkyl substituent in NONOates derivatives on the reaction mechanism of NO liberation. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 138, n. 5, p. 1–11, 2019.

RICHARDSON, G.; BENJAMIN, N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. **Clinical Science**, v. 102, n. 1, p. 99–105, 2002.

RIVERA-TIRADO, E.; LÓPEZ-CASILLAS, M.; WESDEMIOTIS, C. Characterization of diazeniumdiolate nitric oxide donors (NONOates) by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 23, p. 3581–3586, 2011.

SAFAEE FAKHR, B. et al. Inhaled high dose nitric oxide is a safe and effective

respiratory treatment in spontaneous breathing hospitalized patients with COVID-19 pneumonia. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 116, p. 7–13, 2021.

SEHAJPAL, P. K. et al. Reversible S-Nitrosation and Inhibition of HIV-1 Protease †. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13407–13413, 1999.

SHAIKH, N.; VALIEV, M.; LYMAR, S. V. Decomposition of amino diazeniumdiolates (NONOates): Molecular mechanisms. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 141, n. 1, p. 28–35, 2014.

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

SHANNON, M. W.; BORRON, S. W.; BURNS, M. J. **Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose (Fourth Edition)**. 4th Edition ed. [s.l.] W.B. Saunders, 2007.

SWATHI KRISHNA, S.; THENNAVAN, A.; KANTHLAL, S. K. Dietary foods containing nitric oxide donors can be early curators of SARS-CoV-2 infection: A possible role in the immune system. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 1–8, 2022.

TIMERGHAZIN, Q. K.; PESLHERBE, G. H.; ENGLISH, A. M. Resonance description of S-nitrosothiols: Insights into reactivity. **Organic Letters**, v. 9, n. 16, p. 3049–3052, 2007.

TIMERGHAZIN, Q. K.; PESLHERBE, G. H.; ENGLISH, A. M. Structure and stability of HSNO, the simplest S-nitrosothiol. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 11, p. 1532–1539, 2008.

ULLRICH, S.; NITSCHKE, C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 17, p. 127377, 2020.

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. **J Bras Patol Med Lab**, v. 56, p. 1–4, 2020.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021.

WANG, K. et al. New Chemical and Biological Aspects of S-Nitrosothiols. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 821–834, 2012.

WANG, P. G. et al. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1091–1134, 2002.

WELKER, A. et al. Structure-Activity Relationships of Benzamides and Isoindolines

Designed as SARS-CoV Protease Inhibitors Effective against SARS-CoV-2. **ChemMedChem**, v. 16, n. 2, p. 340–354, 2021.

WOLHUTER, K.; EATON, P. How widespread is stable protein S-nitrosylation as an end-effector of protein regulation? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 109, n. February, p. 156–166, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 3 jun. 2021.

WU, D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44–48, 2020.

XIAN, M. et al. Inhibition of papain by S-Nitrosothiols: Formation of mixed disulfides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20467–20473, 2000.

YANG, Y.; HUANG, Z.; LI, L. L. Advanced nitric oxide donors: Chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications. **Nanoscale**, v. 13, n. 2, p. 444–459, 2021.