Universidade de Brasília

Faculdade de Ceilândia – FCE

Curso de Farmácia

Thiago Rodrigues Gabriel

Revisão sobre novas drogas para a Covid-19 a partir de cultura de células.

Brasília, 2020.

Thiago Rodrigues Gabriel

Revisão sobre novas drogas para a Covid-19 a partir de cultura de células.

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à Universidade de Brasília, faculdade de Ceilândia, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof.Dr. Diêgo Madureira de Oliveira.

Brasília, 2020.

Ficha catalográfica elaborada
automaticamente, com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

Gabriel, Thiago Rodrigues

Revisão sobre novas drogas para a Covid-19 a partir de cultura de células. / Thiago Rodrigues Gabriel; orientador Diêgo Madureira de Oliveira. -- Brasília, 2020.

39 p.

1. Cultura de células. 2. Triagem de fármacos. 3. Covid

Thiago Rodrigues Gabriel.

Revisão sobre novas drogas para a Covid-19 a partir de cultura de células.

Banca Examinadora

_____

Orientador: Prof.Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

(Universidade de Brasília)

_____

Prof.Dr. Luis Alexandre Muehlmann

(Universidade de Brasília)

_____

MSc. Tales Henrique Andrade da Mota

(Universidade de Brasília)

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria das Dores Rodrigues, que esteve sempre ao meu lado em todos os bons e maus momentos. Deixo aqui registrado que o mérito de todas as vitórias conquistadas em minha vida também será dela por toda uma vida dedicada, exclusivamente, à minha criação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe por todo o suporte me dado, à minha família por todo amor e carinho, à minha namorada Michele de Castro Fernandes por toda a paciência e carinho. Também agradeço à minha amiga Patrícia Montes por todos os anos de amizade e parceria dentro da universidade e ao meu orientador, Diêgo Madureira, pela paciência em todos os anos de vida acadêmica e pelas oportunidades em nosso grupo de pesquisa.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MERS-CoV – Síndrome respiratória do oriente médio

SARS-CoV – Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 – Síndrome respiratória aguda grave 2.

EC50% - Concentração Efetiva 50%.

CC50%- Concentração Citotóxica 50%.

µM – Concentração em micromolar.

TDF – Fumarato de tenofovir desoproxila.

NHC – N4-Hidroxicitidina.

CTSL-1- Catepsina L1.

TMPRSS2 - Serinaprotease Transmembranar 2.

p38 MAPK – Proteína Quinase Ativadas por Mitogênio p38 de mamífero.

CLQ – Clioquinol.

CLBQ14 - cloro-7-bromo-5-cloro-8-hidroxiquinolina.

CLCQ - 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina.

PDL – Pudilan Xiaoyan.

HNE – Cultura de células do epitélio nasal.

ACE 2 - Enzima conversora de angiotensina 2.

PVP-I – Iodo Povidone.

RBD – Domínio de ligação obrigatória do receptor.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....6
2. JUSTIFICATIVA.....7
3. OBJETIVOS.....8
4. REFERÊNCIAS.....9
5. LISTA DE FIGURAS.....10
6. LISTA DE TABELAS 11
7. ARTIGO.....12
7.1. Resumo.....13
7.2. Introdução.....15
7.3. Metodologia.....16
7.4. Resultados.....18
7.5. Discussão/Conclusão.....28
7.6. Referências.....30
7.7. Material Suplementar (Tabela).....37

INTRODUÇÃO

A SARS-CoV-2 surgiu como um novo patógeno humano e se espalhou pelo globo no início de 2020. A doença possui sintomas como febre, tosse, falta de ar e pode progredir para pneumonia e síndrome respiratória aguda grave. (CONZELMANN et al.,2020). Este vírus possui fita de RNA simples e é classificado, dentre os outros subgrupos de coronavírus, como subgrupo beta, possuindo diversas proteínas em sua composição. (RISNER et al., 2020).

Dentre as proteínas que compõem o vírus, está a proteína S ou Spike. Esta proteína é importante pelo seu papel na interação do vírus com a enzima conversora de Angiotensia (ACE2) da célula hospedeira. Outras proteínas estão envolvidas nessa interação entre o vírus e a célula, dentre elas está a Serina Protease Transmembrana tipo II (TMPRSS2) e Catepsina L1 (CTSL1) (Risner et al., 2020). Algumas proteases também possuem importância, mas estão relacionadas à replicação viral. Proteases como 3CLpro e protease semelhante à papaína (PLpro) são essenciais para a replicação já que processam algumas poliproteínas. (RATHNAYAKE et al., 2020).

Conhecer essas estruturas virais é de suma importância para que se obtenha um alvo e consiga traçar uma estratégia farmacológica no combate ao vírus. Logo, muitos medicamentos são triados na esperança de que possam agir sobre alguma dessas estruturas e,assim, impedir a entrada do vírus na célula ou inibir a replicação viral.

Uma estratégia usada para triar esses fármacos é a triagem por meio da cultura celular. Usando essa estratégia é possível ter mais clareza de resultados além de exercer um estudo de forma mais segura e com menor risco de contaminação pelo vírus (CRUZ et al,.2020).

Pela importância da triagem de fármacos e do uso da cultura celular na triagem dos mesmos, este artigo de revisão possui a intenção de contribuir para uma análise crítica sobre o uso dessa estratégia em meio a uma pandemia. O fato de o artigo já ser uma revisão bibliográfica torna esta introdução mais sucinta para que se obtenha apenas uma noção geral sobre o assunto.

JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), há um total de 63.360.234 casos e 1.475.825 mortes até 02/12/2020 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE,.2020). Logo, mesmo com o desenvolvimento de uma vacina próximo, a busca por medicamentos que possam agir sobre o vírus se mantém. Por isso, é importante saber se o uso de cultura de células na triagem de medicamentos é, de fato, uma estratégia eficiente, já que, estamos susceptíveis a outras pandemias virais e estar preparado para o enfrentamento é um fator determinante no encurtamento do período pandêmico.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é fazer uma revisão bibliográfica sobre estudos que fizeram o uso de agentes terapêuticos em cultura de células, para que essa possa auxiliar no uso da cultura celular em situações futuras parecidas.

REFERÊNCIAS

RATHNAYAKE, jian zheng, yunjeong kim, krishani dinali perera, samantha mackin, david k. meyerholz, maithri m. kashipathy, kevin p. battaile, scott lovell, stanley perlman, william c. groutas, kyeong Chang. 3C-like protease inhibitors block coronavirus replication *in vitro* and improve survival in MERS-CoV–infected mice. Ago,2020.

RISNER, Katie V. Tieu, Yafei Wang, Allison Bakovic, Farhang Alem, Nishank Bhalla, Steven Nathan, Daniel E. Conway, Paul Macklin, Aarthi Narayanan. Maraviroc inhibits SARS-CoV-2 multiplication and s-protein mediated cell fusion in cell culture. bioRxiv, 2020.

CRUZ, Mariana et al . Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. Rev Port Pneumol, Lisboa , v. 15, n. 4, p. 669-682, ago. 2009 .

CONZELMANN, Andrea Gilg, Rüdiger Groß, Desirée Schütz, Nico Preising, Lu dger Ständker, Bernd Jahrsdörfer, Hubert Schrezenmeier, KonstantinM.J. Sparr er, Thomas Stamminger, Steffen Stenger, Jan Münch, JanisA. Müller. An enzyme-based immunodetection assay to quantify SARS-CoV-2 infection. bioRxiv. Jun, 2020.

OPAS. Organização Pan-americana de saúde, 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19#:~:text=Foram%20confirmados%20no%20m undo%2063.360,2%20de%20dezembro%20de%202020. >. Acesso em: 02 de Dezembro de 2020

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da estrutura do sars-cov-2, mostrando as suas principais proteínas contidas.....16

Figura 2: Quadro simplificado que mostra a triagem dos artigos escolhidos.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com todos os fármacos contidos nos dois grupos: “Antivirais” e “Outros fármacos” encontrados nos estudos.....37

ARTIGO

Título: Revisão sobre novas drogas para a Covid-19 a partir de cultura de células.

Autor: Thiago Rodrigues Gabriel.

Professor Orientador: Diêgo Madureira de Oliveira.

Universidade de Brasília – Campus Celiândia – FCE.

Brasília, 2020.

RESUMO

A pandemia causada pelo Coronavírus fez com que o mundo se voltasse para estudos no desenvolvimento de uma vacina ou medicamentos no combate ao vírus. O uso de cultura celular na triagem de fármacos se faz uma importante ferramenta no auxílio dessa triagem. Esta revisão foi composta por um total de 47 artigos, divididos em três grupos: Antivirais, Outros fármacos, Combinações e Anticorpos. Os resultados mostraram que em grande parte dos estudos uma das linhagens mais usadas foi Vero-E6, o que não pode ser uma boa escolha, já que esta linhagem pode se comportar de forma diferente do tecido do trato respiratório, gerando resultados inaplicáveis.

Palavras-Chaves: Cultura de Células; Covid-19; Triagem de fármacos; Linhagens Celular.

ABSTRACT

The pandemic caused by the Coronavirus has caused the world to turn to studies on the development of a vaccine or drugs to fight the virus. The use of cell culture in the screening of drugs is an important tool in assisting this screening. This review consisted of a total of 47 articles, divided into three groups: Antivirals, Other drugs, Combinations and Antibodies. The results showed that in most of the studies one of the most used strains was Vero-E6, which cannot be a good choice, since this strain can behave differently from the respiratory tract tissue, generating inapplicable results.

Key-words: Cell Culture; Covid-19; Drug screening; Cell lines.

Introdução

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (sars-cov-2) é um vírus que pertence à família *coronaviridae* e que possui fita simples de RNA. (QUINHAI MA et al., 2020), (WHANG et al.,2020). Este vírus é composto por quatro proteínas estruturais: pico (s), envelope (e), membrana (m) e nucleocapsídeo (n), sendo a (s) responsável pela adesão do vírus nas células humanas através da interação entre a subunidade 1 e a enzima conversora de angiotensina 2 das células humanas. (CONZELMANN. et al., 2020), (RISNER. et al.,2020), (MARCOLINO. et al.,2020). No início de 2020, o vírus se espalhou pelo mundo, sendo responsável pela síndrome respiratória aguda grave, o que deixou os sistemas de saúde sobrecarregados, fazendo com que os pacientes necessitassem de ventilação mecânica (LEIST et al.,2020) e promovendo uma pandemia, responsável, segundo o ministério da saúde, por 173.120 mil óbitos no brasil até 01/12 de 2020, o que levou o governo federal a implementar medidas de distanciamento social e uso de máscaras. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Embora o mundo caminhe para o desenvolvimento de uma vacina, a doença ainda persiste em nosso meio, isso faz com que se tenha uma urgência na busca por possibilidades terapêuticas e os estudos continuem, dentre eles os estudos com cultura de células. Esses estudos são primordiais para compreender a infecção, biologia, cinética de crescimento, tropismo e triagem de medicamentos inibidores contra sars-cov-2 e promover resultados rápidos. A importância se dá pela capacidade da cultura celular de se comportar como um tecido vivo e, assim, ser uma ferramenta de estudos para a compreensão dessa doença. Porém, uma limitação dos estudos com células é o do risco de contaminação (SCHERWINSKI-PEREIRA et al.,2020) e a de que elas podem sofrer modificações funcionais quando mantidas em cultura (GUMBLETON et al.,2020).

A ideia de uma revisão acerca do uso de cultura celulares a respeito de fármacos usados nos estudos sobre a COVID-19 se deu pela facilidade na manipulação para estudar o desenvolvimento de patologias de forma segura, a nível molecular e genético, visto que pode-se obter resultados preliminares sem precisar de um tecido vivo para a análise (CRUZ et al.,2009), (MAGITA et

al.,2012).Ademais, há uma grande quantidade de fármacos in vitro, surgindo, assim, uma grande necessidade de sistematizar estes dados. Além disso, a cultura de células tende a dar respostas rápidas e informativas, já que oferece dados que contribuem com ferramentas para subsidiar um estudo *in vivo* posterior e auxilia na triagem de novas drogas, descrevendo seus mecanismos e sua toxicidade (MAGITA et al.,2012). Logo, por existir vantagens e limitações sobre o uso de cultura de células, uma revisão sobre o seu uso, nesse contexto de pandemia, poderá trazer conclusões importantes para guiar a escolha dessa estratégia em situações similares futuras.

Assim, o objetivo desse artigo é fazer uma revisão a respeito dos estudos desenvolvidos sobre SARS-Cov-2 que envolveram cultura celular na descrição e desenvolvimento de agentes terapêuticos, a fim de mostrar a importância dela na triagem de novos medicamentos.

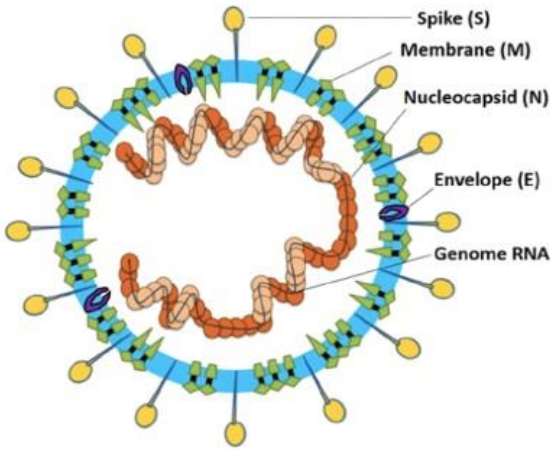

Figura 1: Ilustração da estrutura do sars-cov-2, mostrando as suas principais proteínas contidas. Fonte: li g et al. Coronavirus infections and immune responses. J med virol.2020

Metodologia

O artigo consiste em uma revisão de literatura especializada baseada em critérios minimamente sistemáticos. Dentre eles estão o período em que foi feita a pesquisa dos artigos, bancos de dados definidos e triagem. Os artigos foram pesquisados entre os dias 08/10/2020 e 09/10/2020 em dois bancos de dados diferentes: Pubmed e Scielo.

Estratégia de Busca

Pubmed: Neste banco de dados, pesquisou-se os verbetes *"covid and cells and drugs"; "covid and cells culture and treatment"; "covid and cells culture and in vitro therapy"; "covid and drugs and in vitro"; "cells culture and compound".* Obteve-se, respectivamente, 23, 51, 11, 240 e 22 resultados para cada pesquisa, totalizando 347 artigos. Após a exclusão das repetições, foi obtido um total de 285 artigos.

Scielo: Neste banco de dados, pesquisou-se os verbetes *"covid cells"; "covid cells treatment"; " covid cells in vitro";" covid in vitro".* Obteve-se, respectivamente, 23, 11, 2 e 12 resultados para cada pesquisa, totalizando 48 artigos. Após a exclusão das duplicatas, foi obtido um total de 29 artigos.

Os resultados foram convertidos no formato csv (comma-separeted values) e baixados para uma planilha única no miscrosoft excel 2019. Lá, foram organizados em ordem alfabética e excluídos os artigos encontrados nos dois bancos de dados, alcançando um total de 313 artigos.

Para realizar a triagem dos artigos selecionados, foram estabelecidos alguns critérios de exclusão nesta primeira etapa: os artigos deveriam expressar em seu título estudos *in vitro* em linhagens celulares usando compostos para o tratamento da covid-19. Artigos que não demonstrassem esse conteúdo eram excluídos. Se o título do artigo deixasse dúvida sobre o conteúdo, lia-se o resumo. Se, mesmo assim, o artigo não deixasse claro se expressava estudo *in vitro* em linhagem celular, lia-se o mesmo todo. Um outro critério de exclusão foi o idioma. Os artigos selecionados foram de língua inglesa e portuguesa. Após a aplicação dos critérios, um total de 47 artigos dos 313 artigos foram separados feita, posteriormente, uma leitura minuciosa para esta revisão.

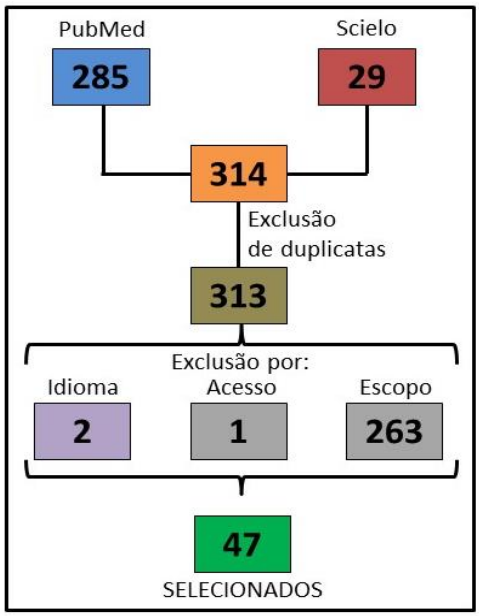

Figura 2: Quadro simplificado que mostra a triagem dos artigos escolhidos. A pesquisa foi feita nos dias 08/10/2020 e 09/10/2020. Os artigos foram convertidos no formado csv e anexados numa planilha do programa Excel. Já na planilha, houve uma reorganização por ordem alfabética por título para dar início ao processo de triagem.

Resultados

Após a leitura dos artigos, percebeu-se uma gama de fármacos que estava sendo estudada, mas não havia, necessariamente, uma separação por grupo ou classe feita pelos trabalhos. Como critério didático, foi feita uma separação dos medicamentos em três grupos: o primeiro foi o grupo dos antivirais, em que os medicamentos que eram usados na clínica com esse propósito eram encaixados. Os outros medicamentos foram reagrupados no grupo dos “outros fármacos”, assim como as combinações desses em outro grupo. Por fim, separou-se, também, os anticorpos que foram usados.

Antivirais

Por não haver fármacos específicos contra o SARS-Cov-2, alguns já conhecidos e outras moléculas não tão conhecidas estão sendo testados na tentativa de inibição ou descoberta de um novo mecanismo de ação contra esse novo vírus. A busca por fármacos já aprovados pode ser uma boa estratégia já que os mesmos possuem estudos que mostram uma melhor segurança. O que

se busca agora é a uma maior eficácia na ação contra o vírus (TIMOTHY S. et al.,2020). Dentre essas moléculas, estão os medicamentos antivirais.

Em uma lista de compostos triados pela biblioteca de Prestwick (Prestwick Chemical Library), foi observado, dentre outros parâmetros, efeito antiviral, EC50% e CC50%. Dessa lista, 17 medicamentos, incluindo dois antivirais, apresentaram atividade antiviral promissora, são eles: Umifenovir (Arbidol) e Remdesivir. (TOURET F. et al.,2020).

Outros compostos como Lopinavir e Ritonavir apresentaram atividade antiviral contra SARS-cov-2 em linhagem de células Vero-E6 e em concentrações abaixo de 100µM. Atualmente, ambos, combinados ou não com Ribavirina, fazem parte do protocolo de tratamento recomendado na China contra o coronavirus (Comissão Nacional de Saúde da China, 2020). Contudo, mesmo apresentando uma redução da carga viral, os dois medicamentos apresentaram efeitos citopáticos, não tendo efeitos significativos em ensaios randomizados (KANG C. et al.,2020). Além disso, A Ribavirina e o Favipiravir, *in vitro*, não mostraram inibição da replicação do vírus em concentrações menores que 100µM (KA-TIM et al.,2020).

Ainda na busca de moléculas seguras e eficazes, está o Maraviroc, uma pequena molécula que obteve aprovação da FDA (Food and Drug Administration) e, *in vitro*, mostrou uma redução da carga viral 30,7 vezes em relação ao grupo controle em linhagens Vero-E6. Essa redução foi demonstrada num ensaio de microscopia confocal onde foi vista uma redução na extensão da fusão celular através da proteína S (RISNER H. et al.,2020).

Outra molécula que se apresentou segura, mas possui uso na medicina veterinária é o GC376. O pró-fármaco (GC376) é usado para tratar peritonite felina infecciosa, uma doença causada por coronavírus em gatos. Logo, pela eficácia do fármaco nessa doença, a molécula despertou interesse para estudos em linhagens celulares. Sabe-se, a princípio, que esse medicamento possui mecanismo de ação agindo na protease 3clpro viral. Essa droga consegue inibir a replicação do SARS-cov-2 em células de linhagem Vero-E6, tornando-se uma boa candidata a estudos clínicos em humanos, já que foram previamente testadas em animais (VUONG W. et al.,2020), (RATHNAYAKE D. et al.,2020).

Seguindo o mesmo alvo molecular (protease 3clpro), o composto Boceprevir, utilizado no tratamento da Hepatite C, também se mostrou promissor. Em ensaios com uma gama de linhagens celulares (A549, MDCK, Caco-2 e Vero), o composto apresentou potentes atividades antivirais, contudo apresentou, também atividade citotóxica (CHUNLONG M. et al.,2020).

Por SARS-cov-2 ser um vírus que possui fita de RNA, alguns medicamentos usados no tratamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram estudados, dentre eles, o Fumarato de Tenofovir Desoproxila. Os dados mostram que Tenofovir (TDF) reduziu a carga viral em até 15 vezes, e que a droga não mostrou citotoxidade detectável em linhagem CCL-81. A hipóteses de mecanismo de ação está na ligação do fármaco com a polimerase de RNA dependente de RNA (CLOSOSKI C. et al.,2020). Um outro fármaco também usado no tratamento do HIV é o Cenicriviroc que mostrou-se eficaz, mas reduziu a carga viral em linhagem Vero-E6 de forma dependente da dose. (OKAMOTO M. et al., 2020)

Alguns outros medicamentos usados no combate ao HIV análogos a nucleosídios foram também testados. São eles: Nelfinavir e Cobicistate. Outro análogo a nucleosídio, mas com ações inibidoras da protease 3C no tratamento de rhinovirus, é o Rupintrivir. Ambos foram testados em células da linhagem A549-h, uma linhagem de carcinoma pulmonar humano, e obtiveram, *in vitro*, efeitos inibidores do vírus (XUPING X. et al.,2020).

A N4-Hidroxicitidina (NHC) que é, também, um ribonucleosídeo análogo com atividade antiviral possui seu mecanismo de ação demonstrado por mutagênese letal, onde mutações se acumulam no RNA viral. NHC foi testada em cultura de células do epitélio respiratório humano infectadas por múltiplos cov humanos e apresentou atividade antiviral reduzindo a replicação viral sem citotoxidade. Contudo, o uso de NHC pode aumentar a carga viral de Sarcoma de Rous e influenza (TIMOTHY S. et al.,2020).

Outros fármacos

No contexto da pandemia da Covid-19, o reposicionamento de fármacos já usados na clínica é uma alternativa rápida, segura e viável devido aos seus resultados nas fases clínicas avançados e características fenotípicas (FERREIRA, L. et al.,2020). Logo, o reposicionamento de fármacos busca uma nova indicação para os fármacos já usados, ajustando os alvos moleculares com a estrutura de uma molécula já conhecida.

Na tentativa de reposicionamento, foi feita uma triagem de fármacos já usados em humanos e liberados pelo FDA para SARS-cov e MERS-cov, reaproveitando em SARS-cov-2. Foram testadas 19 drogas (flufenazina, fluspirileno, benzotropina, amodiaquina, triparanol, terconazol, anisomicina, comipramina, hidroxicloroquina, prometazina, emetina, clorpromazina, toremifeno, tamoxifeno, gencitabina, imatinibe, mefloquina, tietilperazina, imatinibe). As drogas foram testadas em células de linhagem Vero-E6 *in vitro* e se mostraram eficazes também contra SARS-cov-2 (WESTON S. et al.,2020).

Ainda, numa triagem inicial para SARS-cov-2 e em uma lista de compostos presentes na biblioteca Prestwick (A mesma que incluía os dois antivirais), alguns medicamentos apresentaram atividade antiviral promissora *in vitro*, são eles: azitromicina, espiramicina, omeprazol, cloridrato de oxprenolol, hidroxicloroquina, cloridrato de clemizol, alprostadil, dolutegravir, sulfadoxina, dicloridato de opipramol, cloridrato de quinidina, vonoprazan, exemestano, cloridrato de diclonina, espiperona (TOURET F. et al.,2020).

Dentre os fármacos dessa lista, encontra-se a Hidroxicloroquia. Este medicamento, junto com a Cloroquina, de indicação para o combate à malária e ao Lúpus, se tornou famoso devido às grandes polêmicas sobre o seu uso no combate a Covid-19. Sabe-se que ambos inibem a infecção do SARS-CoV-2 *in vitro* de células da linhagem Vero-E6, mas ainda não se sabia, até julho de 2020, se o medicamento inibia a infecção em células do trato respiratório humano. Acredita-se que a cloroquina aumenta o pH de compartimento intracelulares como o sistema endossomal das células e iniba a entrada do vírus, já que o mesmo depende de baixo pH para se inserir na célula. Contudo, o vírus também pode obter outros mecanismos de entrada como o da proteína S. A proteína S é

ativada pela Catepsina L1 (CTSL1) em algumas linhagens celulares, porém, as células do trato respiratório expressam baixo CTSL e dependem de uma protease da membrana plasmática chamada TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2). Logo, a Cloroquina e Hidroxicloroquina podem bloquear a entrada do vírus pela proteína S, mas essa entrada dependeria da linhagem celular usada, já que os fármacos não foram eficientes em linhagens Calu-3 expressando TMPRSS2 (HOFFMANN, M. et al.,2020).

A Cloroquina e Hidroxicloroquina possuem efeitos inibidores *in vitro* contra a Covid-19 usando linhagem Vero-E6. Medindo o EC50% (Concentração efetiva), CC50% (Concentração citotóxica), a Cloroquina obteve uma leve vantagem por possuir uma atividade antiviral maior. Contudo, quando usada outra linhagem celular, a Hidroxicloroquina obteve melhores resultados. Essa vantagem descrita pode estar relacionada aos mecanismos de: dificuldade o reconhecimento do ácido siálico e gangliósido, inibição do processo de acidificação do endossoma, supressão da ação da via p38 MAPK e inibição da fosfolipase A2 (alterando o metabolismo do ácido araquidônico) (SUN J. et al.,2020).

Num modelo feito em Wuhan, na China, com linhagem de células Vero-E6 e, baseado na farmacocinética do fármaco, os pesquisadores descobriram que ambas as drogas afetam o vírus na fase de entrada e pós-entrada na célula. Além disso, mostrou-se que a Hidroxicloroquina foi mais potente que a Cloroquina. (GENDROT, M. et al.,2020). Contudo, em concentrações usuais testadas *in vitro*, a Hidroxicloroquina não mostrou efeitos inibitórios (KANG C. et al.,2020).

No mesmo contexto de triagem de novos fármacos estão alguns outros fármacos que também são usados no combate à malária. Testou-se alguns fármacos como: Quinina, Mefloquina, Desetilamodiaquina (metabólito da amodiaquina), Lumefantrina, Pironaridina, Piperaquina e Ferroquina em atividade antiviral contra SARS-cov-2 na linhagem Vero-E6. Ferroquina, Desetilamodiaquina, Mefloquina, Pironaridina e Quinina mostraram atividade antiviral com IC50% e IC90% compatíveis com a ingestão oral em doses administradas na malária (GENDROT, M. et al.,2020).

Ainda no grupo de fármacos usados contra a malária estão as Artemisininas. Nove derivados de artemisininas foram escolhidas para se testar o potencial em linhagem Vero-E6: Arteeter, arteméter, Ácido artemísico, Artemisinina, Artemisona, Dihidroartemisinina, Artesunate, Arteanuina, Lumefantrina. Dentre essas, a Arteanuína e Lumefantrina bloquearam o SARS-cov-2 após a entrada na célula. Em relação às outras Artemisininas, foi demostrado, num ensaio de imunoflorescência que houve redução das proteínas virais, contudo, essa redução foi dose-dependente. (RUIYUAN C. et al.,2020).

Um outro antiparasitário usado no combate à Doença de Chagas é a Suramina. A mesma mostrou uma inibição na replicação de células da linhagem Vero-E6 e em células epiteliais humanas (HAE), além de diminuir a carga viral em Vero-E6 e Calu-3. Em ensaios de redução e adição da placa, mostraram que o medicamento age na etapa inicial da replicação do vírus. Outra hipótese é a de que seja na entrada do mesmo na célula (SALGADO-BENVINDO, C. et al.,2020).

Também, entre os antiparasitários, encontra-se o Clioquinol (CLQ) e dois análogos, o cloro-7-bromo-5-cloro-8-hidroxiquinolina (CLBQ14) e 5,7-Dicloro-8-hidroxiquinolina (CLCQ) testados em linhagem Vero-E6. Os três compostos inibiram a atividade citopática. Dentre eles, o CLQ foi o mais potente. Em um comparativo, os IC50% foram maiores que Cloroquina, Hidroxicloroquina, Remdesivir e Inibidor de Calpaína IV. Os compostos, *in vitro*, mostraram-se potentes inibidores da atividade de metaloprotease e ligação rhace2 com a proteína S do vírus (OLALEYE O. et al.,2020).

Em relação à inibição dos efeitos citopáticos da linhagem Vero-E6, um outro fármaco de molécula parecida, a Diiodohidroxiquinolina, inibiu cerca de 70% dos efeitos, enquanto outros medicamentos usados no mesmo ensaio de imunoabsorção como Bexaroteno, Cetilistato e Abiterona inibiram os efeitos completamente. (YUAN S. et al., 2020). Assim como Bexaroteno e Abiterona, outros antineoplásicos também obtiveram eficácia em ensaios de viabilidade em linhagem Vero-E6. Bortezomibe, Metotrexato e Avocidib apresentaram maior eficácia (XING J. et al.,2020).

Existem, também, alguns fármacos que podem agir em alvos diferentes da proteína S. Sabe-se que o genoma viral do SARS-cov-2 é capaz de codificar vários tipos de proteínas: estruturais, não-estruturais (como 3CLpro e semelhantes à papaína), helicase e rnapolimerase dependente de RNA. Qualquer fármaco que tenha um mecanismo de ação visando essas proteínas, desperta um interesse para estudo. Dentre esses, encontra-se os fármacos Inibidores da calpaína II e XII (Chunlong M. Et al.,2020). Em uma gama de linhagens celulares (A549, MDCK, Caco-2 e Vero), os compostos apresentaram atividade citotóxica e potentes atividades antivirais. Dentre eles, o mais potente foi o inibidor da calpaína XII, agindo na proteína 3CLpro e semelhante à papaína). Logo, os compostos apresentaram atividade antiviral *in vitro* (CHUNLONG M. et al.,2020).

Além dos Inibidores da calpaína outros compostos como Shikonin (uma droga da medicina chinesa com propriedades antiinflamatórias) , Compostos 6a-k e 7a-k (sintetizados a partir da reação da entrada do álcool com éster metílico de isocianato de leucina ou éster metílico de isocianato de ciclohexilalanina), Aloxistatin e Apilimod mostraram ação na proteína 3clpro em ensaios com linhagem Vero-E6 (LEVIN G. et al., 2020), (RATHNAYAKE D. et al.,2020), (MUGISHA C. et al.,2020).

Outra droga da medicina chinesa e que possui como alvo as proteínas 3CLpro é o Shuanghuanglian, usado para tratamento de doenças do trato respiratório. Este medicamento possui em sua composição duas moléculas chamadas Baicalin e Baicalein, onde a Baicalin mostrou uma atividade antiviral em ensaios com linhagens Vero-E6. O medicamento é consumido na china em forma de líquido oral (HAI-XIA SU. et al.,2020). Assim como essa droga há, também o Pudilan Xiaoyan (PDL), um líquido com efeitos antivirais e antibacterianos. Em linhagem Vero-E6 o PDL foi eficaz e pôde suprimir o vírus *in vitro*. Contudo, os resultados *in vitro* foram melhores do que os resultados in vivo (DENG. et al.,2020).

Dentre as diversas formas pensadas para achar medicamentos eficazes contra a covid-19, uma delas é observar a atividade antiinflamatória de moléculas que agem no trato respiratório. Nessa estratégia, encontram-se dois fármacos: Echinaforce e Ramnocitrina (RH). O primeiro, em estudos com as linhagens

celulares Huh-7, Vero, Vero-E6 e A9 em ensaios de viabilidade celular mostrou uma ação protetiva nas células e inativação do vírus (JOHANNA S. et al.,2020). O segundo, em células endoteliais, mostrou-se como um potente inibidor da ativação endotelial e pneumonia causada pela Covid-19. O mecanismo da Ramnocitrina, demonstrado através de ensaios de imunoflorescência e Westernblot, está na inibição da produção de Ca+, na regulação negativa de STIM-1 e na regulação positiva de mir-185. Além disso, RH inibiu a ativação de nfatc3 (LIN T. et al.,2020).

Ainda sobre o trato respiratório, A Ranitidina e Bismuto mostraram baixa citotoxidade celular e inibiram a replicação celular em células de linhagem Vero-E6. Também diminuíram a carga viral no trato respiratório em camundongos. Os compostos agiram na inibição da ATPase e Helicase viral pelo deslocamento de íons, o que tornou possíveis agentes para o tratamento da covid-19 (SHUOFENG Y. et al.,2020).

Pensando na resposta inflamatória causada pela doença, alguns fármacos também são triados para estudos. Dentre esses, a Irisina, comumente chamada de hormônio do esporte, mostrou uma redução significativa na resposta inflamatória em células de adipócitos humanos (hpad-802S-05). Esta redução se explica pela regulação de alguns genes nos adipócitos, especialmente o TRIB3 que regula a atividade de macrófagos (OLIVEIRA DE, M. et al., 2020).

Fármacos como Camostat e Nafamostat mostraram ação na inibição de proteases virais em culturas de células do epitélio nasal (HNE). Os inibidores de proteases conseguiram inibir e reduzir a atividade viral. Além disso, para dar continuidade ao efeito antiviral é sugerida associação deles com interferons para auxiliar na diminuição da atividade viral. (YAMAYA M. et al.,2020)

A Oleandrina, Fluoxetina, Amiodarona e Imipramina mostaram redução da atividade viral em células da linhagem Vero-E6. A explicação do mecanismo dessa inibição da Oleandrina está na diminuição do ATP onde enzimas como a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) são dependentes (PLANTE S. et al.,2020). Já o dos outros está relacionado com a acidificação endolissômica e acúmulo de colesterol dentro dos endossomos (Schloer S. Et al.,2020).

Por último, cabe ressaltar a importância de estudos que demostrem a eficácia de substâncias antissépticas. Para isso, foi feito um comparativo entre Peróxido de Hidrogênio e Iodo-Povidone (PVP-I). Em células de linhagem Vero-E6 infectadas com o vírus, o PVP-I obteve melhor atividade viricida, o que pode ser preferível o seu uso ao uso de Peróxido de Hidrogênio (AVINASH B. et al.,2020)

Combinações

Diante das estratégias abordadas na busca de novos caminhos no combate ao Coronavírus, tem-se a combinação de fármacos (LOPES et al.,2020). Essa estratégia permite que a sinergia ou antagonismo de fármacos que possuem um efeito sobre o vírus possam ser observados.

Assim sendo, foram identificadas algumas combinações sinérgicas e antagônicas. Dentre as sinérgicas, Nitazoxanida com 3 outros compostos (Remdesivir, Amodiaquina e Umifenovir) apresentaram maior significância contra SARS-Cov-2. Remdesivir e Hidroxicloroquina apresentaram forte antagonismo. Todas as combinações foram testadas em células Vero-E6 e as combinações sinérgicas apresentaram efeitos citopáticos e citotóxicos (BOBROWSKI,T. et al.,2020). Outras combinações sinérgicas envolvendo Remdesivir foi com o fármaco Diltiazen e Emetina (KA-TIM et al.,2020), contudo, quando testada a combinação Remdesivir e Barberina, obteve-se efeitos antagônicos (PIZZORNO A. et al., 2020).

Uma combinação importante foi a de Hidroxicloroquina e Azitromicina. No grupo controle (sem a infecção do vírus), não foi observada citotoxidade. A combinação levou a uma inibição significativa da replicação viral e também foi observada um efeito citopático em alguns poços 60h após a infeção (ANDREANI J. et al.,2020).

Dentre os antimaláricos, a melhor combinação foi Mefloquina-artesunato com porcentagem de inibição de 72,1 ± 18,3%. As outras combinações entre eles mantiveram uma média parecida de 27,1 a 34,1% (GENDROT M. et al.,2020).

Anticorpos

Atualmente, anticorpos monoclonais direcionados a proteínas de superfície viral são cada vez mais reconhecidos como drogas promissoras e têm boa eficácia terapêutica contra outros vírus. Esses anticorpos, em relação ao SARS-Cov-2, visam a glicoproteína de pico (proteína responsável pela entrada do vírus na célula), também chamada de proteína S. Tal proteína possui duas subunidades S1 e S2. A primeira é responsável pela ligação do vírus na célula e a segunda pela fusão viral na membrana celular. Os anticorpos tendem a agir sobre a subunidade S1, impedindo a adesão viral pela desativação do receptor (WANG, C. et al.,2020).

O anticorpo humano 47D11 foi produzido a partir de plasmídeo contendo as regiões de cadeias pesadas Igg1 e cadeia leve Igkappa. A produção dos anticorpos foi feita em linhagem células HEK-293T (WANG, C. et al.,2020). Os resultados mostraram que o anticorpo 47D11 se liga às células que expressam proteínas de pico, especificamente na região RBD em SARS-cov-2. O mesmo anticorpo foi visto como um potente inibidor de infecção de células da linhagem Vero-E6. Logo, esse tipo de anticorpo pode ser útil por alterar o curso da infecção celular além de ajudar a desenvolver testes úteis de detecção e ensaios sorológicos (WANG, C. Et al.,2020).

Um segundo anticorpo chamado de 1A9 tem como alvo a região de alça da subunidade S2 da proteína S de linhagens Vero-E6 e Caco-2. Ensaios por ELISA com esse anticorpo combinado a outros anticorpos de detecções secundárias permitem detectar células infectadas por SARS-cov-2 dois dias após a infecção (CONZELMANN, C. et al.,2020).

Há, também, anticorpos terapêuticos obtidos de plasma de equinos vacinados (Fragmentos de imunoglobulina F). Esses anticorpos agiram impedindo a ligação da proteína de pico recombinante (RBD) com o receptor da

enzima conversora de angiotensina 2 em linhagem celular HeLa (transfectadas por plasmídeo e expressando ACE2) (PAN, X. Et al.,2020).

Discussão/Conclusão

Para que se torne possível uma terapia contra SARS-CoV-2, exige-se modelos celulares robustos. Atualmente, usa-se, principalmente, a linhagem celular Vero-E6, uma linhagem de rim de macaco devido a sua praticidade, imortalização e por expressar a enzima conversora de angiotensina 2. Contudo, são utilizadas, também, as linhagens Calu-3 (linhagem de câncer de pulmão e A549 (Adenocarcinoma de pulmão) (LEIST S. et al.,2020).

Embora a linhagem Vero-E6 expresse ACE2, ela pode não se comportar como células humanas por expressar baixo TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2), exigindo o uso de células do tecido respiratório que expressam essa protease. Isso explica um grande número de medicamentos que possuem eficácia *in vitro*, mas que quando testados em estudos clínicos não apresentaram eficácia. Um exemplo foi a inibição *in vitro* feita pela cloroquina nessa mesma linhagem onde, posteriormente, observou-se em modelos de animais e humanos a ineficácia dos fármacos contra SARS-CoV-2 (Leist S. et al.,2020).

O que se pôde observar nos estudos realizados, foi que poucos usaram linhagem do tecido endotelial respiratório humano, já que SARS-Cov-2 pode infectar pneumócitos tipo II e células epiteliais das vias aéreas. Logo, sugere-se que os ensaios realizados em cultura de células usem tanto a linhagem Vero-E6 quanto alguma linhagem de tecido humano para que se possa analisar os mecanismos de ação dos fármacos nas proteínas expressadas em cada linhagem celular.

Uma outra sugestão, é usar modelos organoides que podem representar a fisiologia in vivo das células susceptíveis num tecido organizado e demonstrar com maior clareza a infecção viral. Contudo, modelos organoides possuem uma desvantagem por não apresentaram componentes originários do

sistema imunológico, como células de defesa (LEIST S. et al.,2020). Logo, o estudo com linhagens celulares continua sendo uma peça fundamental nas fases pré-clinicas, já que a combinação de ambos poderá dar maior clareza aos estudos de triagem de fármacos e compreensão do mecanismo de infecção.

Em relação à triagem de novos fármacos, diversas estratégias neste planejamento são usadas como: acaso, triagens randômicas, modelagem molecular e reposicionamento de fármacos (LOPES et al.,2020). As duas estratégias mais evidentes usadas nos estudos contidos neste trabalho são o reposicionamento de fármacos já usados na clínica e triagens randômicas. A primeira usa medicamentos já aprovados para uso e que já se conhece suas propriedades, facilitando, assim, o seu acesso e a sua comercialização, caso seja comprovada sua eficácia. O segundo é a triagem randômica, que usa uma biblioteca conhecida de fármacos para triagens em larga escala (Lopes et al.,2020). Isso explicaria a gama de medicamentos, combinações, compostos diferentes e distantes contidas neste estudo.

Logo, esta revisão pôde mostrar o progresso, esforço e a importância dos estudos com linhagens celulares na luta contra a Covid-19. O trabalho mostra que é possível testar a eficiência de drogas usando cultura de células, inclusive em uma situação futura de pandemia. Entretanto, testar essa eficiência numa linhagem celular (Vero-E6) de um tecido distante do trato respiratório pode não ser uma boa estratégia, já que, como visto, os resultados foram diferentes para uma mesma droga. Uma boa estratégia pode ser usar a linhagem Vero-E6 para estudos de caracterização, descrevendo as proteínas e estruturas virais, e usar linhagens com características próximas do trato respiratório para realizar a triagem de fármacos e aumentar a chance de resultados aplicáveis. Espera-se que esta revisão possa contribuir, de forma mais clara, com uma melhor compreensão sobre a doença e o que já se sabe sobre ela.

Referências

COVID SAÚDE. Ministério da Saúde, 2018. Disponível em:<https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em:11 de nov de 2020.

CRUZ, Mariana et al . Modelos experimentais em oncologia: O contributo da cultura de células para o conhecimento da biologia do cancro. Rev Port Pneumol, Lisboa , v. 15, n. 4, p. 669-682, ago. 2009 .

MIGITA, Natacha Azussa. Cultivo celular *in vitro*: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. Repositório UNESP, 2012.

KANG CK, Seong MW, Choi SJ, et al. *In vitro* activity of lopinavir/ritonavir and hydroxychloroquine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 at concentrations achievable by usual doses. Korean J Intern Med. 2020

14-CLOSOSKI, Giuliano C. et al . Tenofovir Disoproxil Fumarate: New Chemical Developments and Encouraging *in vitro* Biological Results for SARS-CoV-2. J. Braz. Chem. Soc., São Paulo , v. 31, n. 8, p. 1552-1556, Aug. 2020 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532020000801552&lng=en&nrm=iso>. access on 11 Nov. 2020. Epub July 27, 2020.

HOFFMANN, M., Mösbauer, K., Hofmann-Winkler, H. et al. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. Nature 585, 588–590 (2020)

SUN J, Chen Y, Fan X, Wang X, Han Q, Liu Z. Advances in the use of chloroquine and hydroxychloroquine for the treatment of COVID-19. Postgrad Med. 2020

FERREIRA, Leonardo L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D.. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. Estud. av., São Paulo , v. 34, n. 100, p. 7-27, Dec. 2020 .

LOPES, J. R., Imperador, C. H. L., Chin, C. M., & dos Santos, J. L. Desenvolvimento de fármacos para tratamento da covid-19. ulakes journal of medicine: v. 1. 2020

GENDROT M, Duflot I, Boxberger M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: *In vitro* inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. Int J Infect Dez. 2020

DENG, W., Xu, Y., Kong, Q. et al. Therapeutic efficacy of Pudilan Xiaoyan Oral Liquid (PDL) for COVID-19 *in vitro* and in vivo. Sig Transduct Target Ther 5, Dez 2020

TONG LIN, Wenwei Luo, Ziqing Li, Lili Zhang, Xinghan Zheng, Liting Mai, Wanqi Yang, Guimei Guan, Ziren Su, Peiqing Liu, Zhuoming Li, Youliang Xie,Rhamnocitrin extracted from Nervilia fordii inhibited vascular endothelial activation via miR-185/STIM1/SOCE/NFATc3,Phytomedicine,Volume 79,2020.

YAMAYA M, Nishimura H, Deng X, Kikuchi A, Nagatomi R. Protease Inhibitors: Candidate Drugs to Inhibit Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication. Tohoku J Exp Med. Maio 2020.

ANDREANI J, Le Bideau M, Duflot I, Jardot P, Rolland C, Boxberger M, Wurtz N, Rolain JM, Colson P, La Scola B, Raoult D. *In vitro* testing of combined hydroxychloroquine and azithromycin on SARS-CoV-2 shows synergistic effect. Microb Pathog. Ago 2020.

YUAN S, Chan JFW, Chik KKH, Chan CCY, Tsang JOL, Liang R, Cao J, Tang K, Chen LL, Wen K, Cai JP, Ye ZW, Lu G, Chu H, Jin DY, Yuen KY. Discovery of the FDA-approved drugs bexarotene, cetilistat, diiodohydroxyquinoline, and abiraterone as potential COVID-19 treatments with a robust two-tier screening system. Pharmacol Res. Set 2020.

OKAMOTO, Masaaki Toyama, Masanori Baba,The chemokine receptor antagonist cenicriviroc inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*,Antiviral Research,Volume 182, 2020.

PIZZORNO Andrés, Blandine Padey, Julia Dubois, Thomas Julien, Aurélien Traversier, Victoria Dulière, Pauline Brun, Bruno Lina, Manuel Rosa-Calatrava, Olivier Terrier,*In vitro* evaluation of antiviral activity of single and combined repurposable drugs against SARS-CoV-2,Antiviral Research,Volume 181,2020

LI, G, Fan, Y, Lai, Y, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020.

BOBROWSKI, Lu Chen, RichardT. Eastman, Zina Itkin, Paul Shinn, Cat herine Chen, Hui Guo, Wei Zheng, Sam Michael, Anton Simeonov, MattheD. H all, Alexey V. Zakharov, Eugene N. Muratov Discovery of Synergistic and Antagonistic Drug Combinations against SARS-CoV-2 *In Vitro* bioRxiv. 2020

TOURET, Magali Gilles, Karine Barral, Antoine Nougairède, Etienne Dec roly, Xavier deLamballerie, Bruno Coutard. *In vitro* screening of a FDA approved chemical library reveals potential inhibitors of SARS-CoV-2 replication, bioRxiv, 2020.

KA-TIM; Wong, Alvina Yin-Lam; Kaewpreedee, Prathanporn; Sia, Sin Fun; Chen, Dongdong; Hui, Kenrie Pui Yan; Chu, Daniel Ka Wing; Chan, Michael Chi Wai; Cheung, Peter Pak-Hang; Huang, Xuhui; Peiris, Malik; Yen, Hui-Ling. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication *in vitro*. Antiviral Res, 2020.

RISNER, Katie V. Tieu, Yafei Wang, Allison Bakovic, Farhang Alem, Nishank Bhalla, Steven Nathan, Daniel E. Conway, Paul Macklin, Aarthi Narayanan. Maraviroc inhibits SARS-CoV-2 multiplication and s-protein mediated cell fusion in cell culture. bioRxiv, 2020.

RATHNAYAKE, jian zheng, yunjeong kim, krishani dinali perera, samantha mackin, david k. meyerholz, maithri m. kashipathy, kevin p. battaile, scott lovell, stanley perlman, william c. groutas, kyeong Chang. 3C-like protease inhibitors block coronavirus replication *in vitro* and improve survival in MERS-CoV–infected mice. Ago,2020.

LEVIN, Zachary A; Liu, Cheng; Jekle, Andreas; Jaisinghani, Ruchika; Ren, Suping; Vandyck, Koen; Jochmans, Dirk; Leyssen, Pieter; Neyts, Johan; Blatt,

Lawrence M; Beigelman, Leonid; Symons, Julian A; Raboisson, Pierre; Scholle, Michael D; Deval, Jerome. Evaluation of SARS-CoV-2 3C-like protease inhibitors using self-assembled monolayer desorption ionization mass spectrometry. Antiviral Res, Set, 2020.

VUONG, Muhammed Bashir Khan, Conrad Fischer, Elena Arutyunova, Tess Lamer, Justin Shields, Holly A. Saffran, Ryan T. McKay, Marco J. van Belkum, Michael Joyce, Howard S. Young, D. Lorne Tyrrell, John C. Vederas, M. Joanne Lemieux. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. bioRxiv. Ago, 2020.

CHUNLONG Ma, Brett Hurst, Yanmei Hu, Tommy Szeto, Bart Tarbet, Jun Wang. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. bioRxiv. Abril, 2020.

XUPING; Muruato, Antonio E; Zhang, Xianwen; Lokugamage, Kumari G; Fontes-Garfias, Camila R; Zou, Jing; Liu, Jianying; Ren, Ping; Balakrishnan, Mini; Cihlar, Tomas; Tseng, Chien-Te K; Makino, Shinji; Menachery, Vineet D; Bilello, John P; Shi, Pei-Yong. A nanoluciferase SARS-CoV-2 for rapid neutralization testing and screening of anti-infective drugs for COVID-19. bioRxiv, 2020.

TIMOTHY P; Sims, Amy C; Zhou, Shuntai; Graham, Rachel L; Pruijssers, Andrea J; Agostini, Maria L; Leist, Sarah R; Schäfer, Alexandra; Dinnon, Kenneth H; Stevens, Laura J; Chappell, James D; Lu, Xiaotao; Hughes, Tia M; George, Amelia S; Hill, Collin S; Montgomery, Stephanie A; Brown, Ariane J; Bluemling, Gregory R; Natchus, Michael G; Saindane, Manohar; Kolykhalov, Alexander A; Painter, George; Harcourt, Jennifer; Tamin, Azaibi; Thornburg, Natalie J; Swanstrom, Ronald; Denison, Mark R; Baric, Ralph S. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. Transl Med .Abril, 2020.

MUGISHA, Hung R. Vuong, Maritza Puray-Chavez, Adam L. Bailey, Julie M. Fox, Rita E. Chen, Alex W. Wessel, Jason M. Scott, Houda H. Harastani, Adrianus C. M. Boon, Haina Shin, Sebla B. Kutluay. A Simplified Quantitative Real-Time PCR Assay for Monitoring SARS-CoV-2 Growth in Cell Culture. mSphere, Set, 2020.

SU, Hai-Xia; Yao, Sheng; Zhao, Wen-Feng; Li, Min-Jun; Liu, Jia; Shang, Wei-Juan; Xie, Hang; Ke, Chang-Qiang; Hu, Hang-Chen; Gao, Mei-Na; Yu, Kun-Qian; Liu, Hong; Shen, Jing-Shan; Tang, Wei; Zhang, Lei-Ke; Xiao, Geng-Fu; Ni, Li; Wang, Dao-Wen; Zuo, Jian-Ping; Jiang, Hua-Liang; Bai, Fang; Wu, Yan; Ye, Yang; Xu, Ye-Chun. Anti-SARS-CoV-2 activities *in vitro* of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. Acta Pharmacol Sin. Set, 2020.

WESTON, Christopher M. Coleman, Rob Haupt, James Logue, Krystal Matthews, Matthew B. Frieman. Broad anti-coronaviral activity of FDA approved drugs against SARS-CoV-2 *in vitro* and SARS-CoV in vivo. bioRxiv. Mar, 2020.

AVINASH S; Pelletier, Jesse S; Westover, Jonna B; Frank, Samantha; Brown, Seth M; Tessema, Belachew.J. Comparison of *In Vitro* Inactivation of SARS CoV-2 with Hydrogen Peroxide and Povidone-Iodine Oral Antiseptic Rinses.Prosthodont. Jun, 2020.

OLALEYE; Manvir Kaur; Collins C Onyenaka; Tolulope O Adebusuyi. Discovery of Clioquinol and Analogues as Novel Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection, ACE2 and ACE2 - Spike Protein Interaction *In Vitro*. bioRxiv. Abril, 2020.

JOHANNA; Jonsdottir, Hulda R; Albrich, Werner C; Strasser, Marc; Züst, Roland; Ryter, Sarah; Ackermann-Gäumann, Rahel; Lenz, Nicole; Siegrist, Denise; Suter, Andreas; Schoop, Roland; Engler, Olivier B. *In vitro* virucidal activity of Echinaforce®, an Echinacea purpurea preparation, against coronaviruses, including common cold coronavirus 229E and SARS-CoV-2.Virol J, 2020.

DE OLIVEIRA, Miriane; De Sibio, Maria Teresa; Mathias, Lucas Solla; Rodrigues, Bruna Moretto; Sakalem, Marna Eliana; Nogueira, Célia Regina. Irisin modulates genes associated with severe coronavirus disease (COVID-19) outcome in human subcutaneous adipocytes cell culture. Mol Cell Endocrinol. Set, 2020.

YUAN, Shuofeng; Wang, Runming; Chan, Jasper Fuk-Woo; Zhang, Anna Jinxia; Cheng, Tianfan; Chik, Kenn Ka-Heng; Ye, Zi-Wei; Wang, Suyu; Lee, Andrew Chak-Yiu; Jin, Lijian; Li, Hongyan; Jin, Dong-Yan; Yuen, Kwok-Yung;

Sun, Hongzhe. Metallodrug ranitidine bismuth citrate suppresses SARS-CoV-2 replication and relieves virus-associated pneumonia in Syrian hamsters. Nat Microbiol. Nov, 2020.

QINHAI; Li, Runfeng; Pan, Weiqi; Huang, Wenbo; Liu, Bin; Xie, Yuqi; Wang, Zhoulang; Li, Chufang; Jiang, Haiming; Huang, Jicheng; Shi, Yongxia; Dai, Jun; Zheng, Kui; Li, Xiaobo; Hui, Min; Fu, Li; Yang, Zifeng. Phillyrin (KD-1) exerts anti-viral and anti-inflammatory activities against novel coronavirus (SARS-CoV-2) and human coronavirus 229E (HCoV-229E) by suppressing the nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway. Phytomedicine. Nov, 2020.

PLANTE, Jessica A. Plante, Diana Fernandez, Divya Mirchandani, Nathen Bopp, Patricia V. Aguilar, K. Jagannadha Sastry, Robert A. Newman, Scott C. Weaver. Prophylactic and Therapeutic Inhibition of *In Vitro* SARS-CoV-2 Replication by Oleandrin. bioRxiv. Ago, 2020.

XING, Rama Shankar, Aleksandra Drelich, Shreya Paithankar, Eugene Chekalin, Thomas Dexheimer, Surender Rajasekaran, Chien-Te Kent Tseng, Bin Chen. Reversal of Infected Host Gene Expression Identifies Repurposed Drug Candidates for COVID-19. bioRxiv. Abril, 2020.

SALGADO-BENVINDO, Clarisse; Thaler, Melissa; Tas, Ali; Ogando, Natacha S; Bredenbeek, Peter J; Ninaber, Dennis K; Wang, Ying; Hiemstra, Pieter S; Snijder, Eric J; van Hemert, Martijn J. Suramin Inhibits SARS-CoV-2 Infection in Cell Culture by Interfering with Early Steps of the Replication Cycle. Antimicrob Agents Chemother. Jul, 2020.

SCHLOER; Linda Brunotte; Jonas Goretzko; Angeles Mecate-Zambrano; Nadja Korthals; Volker Gerke; Stephan Ludwig; Ursula Rescher. Targeting the endolysosomal host-SARS-CoV-2 interface by the clinically licensed antidepressant fluoxetine. bioRxiv. Ago,2020.

RUIYUAN; Hu, Hengrui; Li, Yufeng; Wang, Xi; Xu, Mingyue; Liu, Jia; Zhang, Huanyu; Yan, Yunzheng; Zhao, Lei; Li, Wei; Zhang, Tianhong; Xiao, Dian; Guo, Xiaojia; Li, Yuexiang; Yang, Jingjing; Hu, Zhihong; Wang, Manli; Zhong, Wu. Anti-SARS-CoV-2 Potential of Artemisinins *In Vitro*. ACS Infect Dis. Set,2020.

GENDROT, Mathieu; Andreani, Julien; Boxberger, Manon; Jardot, Priscilla; Fonta, Isabelle; Le Bideau, Marion; Duflot, Isabelle; Mosnier, Joel; Rolland, Clara; Bogreau, Hervé; Hutter, Sébastien; La Scola, Bernard; Pradines, Bruno. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An *in vitro* evaluation. Travel Med Infect Dis. 2020.

LEIST, Alexandra Schäfer, David R. Martinez. Cell and animal models of SARS-CoV-2 pathogenesis and immunity. Disease Models & Mechanisms. Set, 2020.

WANG, Wentao Li, Dubravka Drabek, Nisreen M.A. Okba, Rien van Haperen, Albert D.M.E. Osterhaus, Frank J.M. van Kuppeveld, Bart L. Haagmans, Frank Grosveld, Berend-Jan Bosch. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. bioRxiv. Mar, 2020.

PAN, Pengfei Zhou, Tiejiong Fan, Yan Wu, Jing Zhang, Xiaoyue Shi, Weijuan Shang, Lijuan Fang, Xiaming Jiang, Jian Shi, Yuan Sun, Shaojuan Zhao, Rui Gong, Ze Chen, Gengfu Xiao. Immunoglobulin fragment F(ab')2 against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 *in vitro*. bioRxiv. Abril, 2020.

SCHERWINSKI-PEREIRA,. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

GUMBLETON, Mark; AUDUS, Kenneth L. Progress and limitations in the use of *in vitro* cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. Journal of pharmaceutical sciences, v. 90, 2001.

CONZELMANN, Andrea Gilg, Rüdiger Groß, Desirée Schütz, Nico Preis ing, Ludger Ständker, Bernd Jahrsdörfer, Hubert Schrezenmeier, KonstantinM.J . Sparrer, Thomas Stamminger, Steffen Stenger, Jan Münch, JanisA. Müller. An enzyme-based immunodetection assay to quantify SARS-CoV-2 infection. bioRxiv. Jun, 2020.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Antivirais	Outras Drogas					
Boceprevir	Abiraterona	Azitromicina	Dihidroartemisinina	Homoharrigtonina	Piperaquina	Triparanol
Cenicriviroc	Ácido Artemísico	Barberina	Diiodohidroxiquinolina	Imatinibe	Pironaridina	Vonoprazan
Cobicistat	Aloxistatin (E64-D) E64D	Benzatropina	Dissulfiram	Imipramina	Prometazina	
Favipiravir	Alprostadil	Bexaroteno	Dolutegravir	Inibidores da Calpaína II, XII	Pudilan Xiaoyan	
Tenofovir	Alvocid	Bortezomibe	Ebselen	Iodo-Povidone (PVP-I)	Quinidina	
GC376	Amiodarona	Camostat	Echinaforce	Irisina	Quinina	
Hidroxicitidina	Amodiaquina	Cetilistato	Emetina	Lumefantrina	Ramnocitrina	
Lopinavir	Anisiomicina	Ciclosporina A	Espiperona	Mefloquina	Ranitidina	
Maraviroc	Apilimod	Clemizol	Espiramicina	Metotrexato	Shikonin	
Nelfinavir	Arteanuína	Clioquinol	Ferroquina	Nafamostat	Shuanghuanglian	
Nitazoxanida	Arteéter	Cloroquina	Fingolimod	Oleandrina	Sulfadoxina	
Pupintrivir	Arteméter	Clorpromazina	Flufenazina	Omeprazol	Suramina	
Remdesivir	Artemisinina	Comipramina	Fluspirileno	Opipramol	Tamoxifeno	
Ribavirina	Artemisinona	Compostos 6a-k e 7a-k	Fluxetina	Oxprenolol	Terconazol	
Ritonavir	Artesunate	Desetilamodiaquina	Gencitabina	Peróxido de Hidrogênio	Tietilperazina	
Umifenovir(Arbidol)	Atorvastatina	Diclonina	Hidroxicloroquina	Phillyrin (KD-1)	Toremifeno	

Tabela 1. Tabela com todos os fármacos contidos nos dois grupos: "Antivirais" e "Outros fármacos" encontrados nos estudos.