

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Ian de Meira Chaves

SCREENING DE CANDIDATOS ANTIVIRAIS CONTRA CORONAVÍRUS

Belo Horizonte

2024

Ian de Meira Chaves

SCREENING DE CANDIDATOS ANTIVIRAIS CONTRA CORONAVÍRUS

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Mauro Martins Teixeira

Coorientadora: Profa. Vivian Vasconcelos Costa

Belo Horizonte

2024

043

Chaves, Ian de Meira.

Screening de candidatos antivirais contra coronavírus [manuscrito] / Ian de Meira Chaves. – 2024.

135 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Mauro Martins Teixeira. Coorientadora: Profa. Vivian Vasconcelos Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia celular. 2. COVID-19. 3. SARS-CoV-2. 4. Antivirais. 5. Reposicionamento de Medicamentos. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Costa, Vivian Vasconcelos. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE TESE

IAN DE MEIRA CHAVES

Às **treze horas** do dia **31 de outubro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “ **SCREENING DE CANDIDATOS ANTIVIRAIS CONTRA CORONAVIRUS**”, requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de outubro de 2024.**

Prof./Pesq.	Instituição
Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira	UFMG
Profa Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski	UFMG
Profa Dra. Karine Lima Lourenço	UFMG
Profa Dra. Cristiana Couto Garcia	Fiocruz/BH
Profa Dra. Milene Dias Miranda	Fiocruz/RJ
Prof. Dr. Daniel Santos Mansur	UFSC

Belo Horizonte, 01 de novembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Couto Garcia, Usuária Externa**, em 01/11/2024, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 01/11/2024, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Lima Lourenço, Usuário Externo**, em 04/11/2024, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Martins Teixeira, Professor do Magistério Superior**, em 05/11/2024, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milene Dias Miranda, Usuário Externo**, em 05/11/2024, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Santos Mansur, Usuário Externo**, em 06/11/2024, às 15:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3693604** e o código CRC **D66529F1**.

Agradecimentos

Aos meus orientadores Mauro e Vivian, agradeço profundamente por todos esses anos de orientação, suporte, disponibilidade, excelência e paciência. Foi e sempre será um prazer e um privilégio trabalhar com vocês. Tenho muito orgulho de ter seus nomes associados à minha tese.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular.

A todos os que colaboraram, de alguma forma, com este projeto, em especial o Filipe, Leo, Larisse, Celso, Ana Cláudia, Victor, Dani, Felipe, Talita, Rafa e Jordane.

Ao Laboratório LANAGRO, que no início da Pandemia se fez disponível para experimentos.

Ao Laboratório de Nível de Biossegurança 3 – NB3 - ICB UFMG, onde foram conduzidos a maior parte dos experimentos que necessitavam de biossegurança nível 3.

Ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e todo o grupo Imunofar. Tenho muito orgulho de estar há 10 anos fazendo ciência em um grupo de tamanha excelência.

Ao grupo GPA/V. Foi e sempre será um enorme prazer poder participar deste grupo de pesquisa.

À UFMG. Já são 10 anos que eu tenho enorme orgulho de ser parte dessa Universidade.

À equipe técnico-administrativo da UFMG.

Às agências de fomento.

À minha mãe, meu pai e meu irmão que sempre me apoiaram em todos os âmbitos da minha vida. Dentro da família, agradeço a Nina, minha cachorrinha, e ao Ozzy, meu irmãozinho de quatro patas que esteve comigo por 17 anos.

À minha namorada Gabi, que me sempre esteve do meu lado, me apoiando, encorajando nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos, pela farra e apoio em que nunca soltaram a minha mão.

Às professoras Mila e Dani, que foram tão importantes para minha formação científica e hoje são grandes amigas.

Ao Leo Camilo, que me ensinou toda a parte técnica em virologia que eu pude desenvolver e aprimorar ao longo do meu doutorado.

Ao Nam-Joon Cho da *Nanyang Technological University* e Raymond F. Schinazi da *Emory University School of Medicine*, pelo fornecimento de moléculas testadas neste trabalho.

Resumo

A COVID-19 causou mais de sete milhões de mortes globalmente e sobrecarregou os sistemas de saúde de diversos países. Além disso, a infecção pelo SARS-CoV-2 pode levar a sintomas prolongados, conhecidos como COVID Longa, que afetam mais de 100 milhões de pessoas em todo o mundo e estão associados a impactos socioeconômicos. A doença está associada a altos títulos virais, comumente acompanhados por uma resposta inflamatória exacerbada, caracterizada pela tempestade de citocinas. As mutações presentes em novas variantes do vírus são constantemente associadas a maior transmissibilidade e maior evasão imune.

O MHV, assim como o SARS-CoV-2, é um betacoronavírus que tem sido empregado como ferramenta de estudo em laboratório de nível de biossegurança nível 2. Aqui, propomos a triagem de diferentes moléculas com potencial antiviral contra a infecção por coronavírus, incluindo: i) os flavonoides Baicaleína e seu metabólito, baicalina, que já demonstraram efeitos anti-adsorção no contexto de infecção por outros vírus de RNA de fita simples senso positivo; ii) o peptídeo alpha-helicoidal (AH-D), que tem como alvo o envelope lipídico viral; iii) um análogo de nucleosídeo, o 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine (DFMA).

A baicalina e a baicaleína não apresentaram efeitos na redução dos títulos virais ou na restauração da viabilidade celular em células L929 infectadas com o MHV-3. Em seguida, testamos o peptídeo AH-D, que foi capaz de reduzir os títulos virais do MHV em concentrações a partir de 50nM e do SARS-CoV-2 a partir de 125nM, também prevenindo a morte das células L929 em resposta à infecção por MHV-3. Ensaios *in vitro* revelaram que o DFMA foi eficaz contra tanto o MHV-3 quanto o MHV-A59, assim como contra o SARS-CoV-2, apresentando um índice de seletividade de 6,2. Além disso, experimentos *in vivo* demonstraram que o DFMA reduziu significativamente as cargas virais nos três modelos de infecção e diminuiu os níveis de mediadores inflamatórios importantes, incluindo CXCL1, CCL2 e IL-6, nos pulmões de camundongos infectados. Esses achados sugerem um promissor efeito antiviral do DFMA, não apenas contra o SARS-CoV-2, mas também contra outros coronavírus que possam surgir.

Palavras chave: COVID-19; MHV-3; MHV-A59; SARS-CoV-2, antivirais; reposicionamento de drogas.

Abstract

COVID-19 has caused more than seven million deaths globally and overwhelmed the healthcare systems of several countries. Additionally, SARS-CoV-2 infection can lead to prolonged symptoms, known as Long COVID, which affect more than 100 million people worldwide and are associated with socioeconomic impacts. The disease is linked to high viral loads, often accompanied by an exacerbated inflammatory response, characterized by a cytokine storm. Mutations in new variants of the virus are consistently associated with increased transmissibility and greater immune evasion.

MHV, like SARS-CoV-2, is a betacoronavirus that has been used as a research tool in biosafety level 2 laboratories. Here, we propose the screening of various molecules with antiviral potential against coronavirus infection, including: i) the flavonoids Baicalein and its metabolite, baicalin, which have already demonstrated anti-adsorption effects in the context of infection by other positive ssRNA virus; ii) the alpha-helical peptide (AH-D), which targets the viral lipid envelope; iii) a nucleoside analog, DFMA.

The results showed that baicalin and baicalein did not exhibit effects in reducing viral titers or in restoring cell viability in L929 cells infected with MHV-3. Therefore, further testing with these compounds was not conducted. Next, we tested the AH-D peptide, which was able to reduce MHV viral titers at concentrations starting from 50nM and SARS-CoV-2 from 125nM, also restoring the viability of L929 cells in response to MHV-3 infection. In vitro assays revealed DFMA to be effective against both MHV-3 and MHV-A59, as well as SARS-CoV-2, with a Selectivity Index (SI) of 6.2. Furthermore, in vivo experiments demonstrated that DFMA significantly reduced viral loads in all three infection models and decreased levels of inflammatory mediators, including CXCL1, CCL2, and IL-6, in the lungs of infected mice. These findings suggest that DFMA holds promise as an antiviral agent not only against SARS-CoV-2 but also against other coronaviruses that may emerge.

Keywords: COVID-19; MHV-3; MHV-A59; SARS-CoV-2; antivirals.

Lista de Figuras

Figura 1. Imagem demonstrativa dos sintomas agudos relacionados à COVID-19. .	17
Figura 2. Figura demonstrativa de acometimentos causados pela Long COVID-19 que afetam diferentes sistemas e órgãos.....	19
Figura 3. Partícula viral do vírus SARS-CoV-2, apontando suas proteínas estruturais do nucleocapsídeo (N), proteína Spike (S), proteína M e proteína do envelope (E).	21
Figura 4. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2 com detalhamento do genoma viral.	23
Figura 5. Figura 5. Padronização e protocolo experimental de infecção para testes de potenciais antivirais in vitro.....	35
Figura 6. Figura 6 Protocolo experimental de infecção e tratamento com o DFMA nos diferentes modelos experimentais.....	40
Figura 7. Cinética da infecção por MHV-3 e MHVA-59 em células L929.	44
Figura 8. Avaliação do potencial antiviral da Baicalina ou Baicaleína in vitro contra o vírus MHV-3 em células L929.	46
Figura 9. Avaliação do potencial antiviral do peptídeo AH-D contra o vírus MHV-3 em células L929.	48
Figura 10. Teste de potencial ação virucida do peptídeo AH-D quando incubado com o inóculo viral previamente à infecção.	50
Figura 11. Avaliação do análogo de nucleosídeo DFMA como potencial antiviral contra o vírus MHV-3 em células L929.	51
Figura 12. Avaliação da atividade antiviral do composto DFMA contra o vírus MHV-A-59 em células L929.	53
Figura 13. Citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral do DFMA in vitro contra o SARS-CoV-2.	55
Figura 14. Efeitos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-3 in vivo...	57
Figura 15. Efeitos sistêmicos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-3 in vivo.	59
Figura 16. Efeitos do DFMA contra o MHV-A59 in vivo.....	62
Figura 17. Efeitos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-A59 in vivo.	63
Figura 18. Efeito do tratamento com DFMA na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE2.....	65
Figura 19. Parâmetros inflamatórios pulmonares do tratamento com DFMA na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE2.	67
Figura 20. Ilustração do trabalho apresentando o mecanismo de ação proposto para cada composto testado.	75

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos testados.....	33
-----------------------------------	----

Lista de abreviaturas

μL – Microlitro.

μM – Micromolar.

Abs – Absorbância.

ACE2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2.

AH-D – Peptídeo Alpha-Helicoidal.

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro.

CCL – Ligante de Quimiocina CC.

cDNA – DNA Complementar.

CMC – Carboximetilcelulose.

CXCL – Ligante de Quimiocina CXC.

d.p.i. – Dias Pós-infecção.

DENV – Vírus da Dengue.

DENV-2 – Vírus da Dengue Tipo 2.

DFMA – 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine (Análogo de Nucleosídeo).

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

dsRNA – RNA de Fita Dupla.

EC50 – Concentração Efetiva 50%.

EPM – Erro Padrão da Média.

EPM – Erro Padrão da Média.

g – Grama.

G-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos.

gRNA – RNA Genômico.

i.n. – Via Intranasal.

IC50 – Concentração Inibitória 50%.

IFN γ – Interferon Gama.

IL – Interleucina.

IS – Índice de Seletividade.

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa.

Kg – Quilograma.

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário.

LDH – Lactato Desidrogenase.

mAbs – Anticorpos Monoclonais.

MERS-CoV – Síndrome respiratória do Oriente Médio.

mg – Miligrama.

MHV – Vírus da Hepatite Murina.

MOI – Multiplicidade de Infecção.

mRNA – RNA Mensageiro.

NB-2 – Nível de Biossegurança 2.

NB-3 – Nível de Biossegurança 3.

nM – Nanomolar.

nsp – Proteína Não Estrutural.

NTU – Nanyang Technological University of Singapore.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

ORF – Região de Leitura Aberta (Open Reading Frame).

PMBC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell*.

PBS – Solução Salina Tampão Fosfato (Phosphate buffered saline).

pp1a – Poliproteína 1^a.

pp1ab – Poliproteína 1ab.

PRF – Deslocamento Programado de Quadro de Leitura (Programmed Ribosomal Frameshift).

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa.

RBD – Domínio de Ligação ao Receptor (Receptor-Binding domain).

RdRp – RNA Polimerase Dependente de RNA (RNA-dependent RNA polymerase).

RE – Retículo Endoplasmático.

RNA – Ácido Ribonucleico.

S1 – Subunidade S1 da Proteína Spike.

S2 – Subunidade S2 da Proteína Spike.

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave (Severe Acute Respiratory Syndrome).

SFB – Soro Fetal Bovino.

sgRNA – RNA Subgenômico.

TMPRSS2 – (Transmembrane protease, serine 2).

TNF – Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor).

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais.

UFP – Unidades Formadoras de Placa.

UTR – Região Não Traduzida (Untranslated Region).

Veíc – Veículo.

WHO – World Health Organization.

YFV – Vírus da febre amarela.

ZIKV – *Zika virus*.

Sumário

1. Introdução	16
1.1) Sintomas.....	16
1.2) Transmissão e variantes.....	19
1.3) Estrutura Viral.....	20
1.4) Ciclo de replicação viral.....	21
1.5) Vacinas.....	25
1.6) Anticorpos monoclonais.....	25
1.7) Tempestade de citocinas e abordagens terapêuticas.....	26
1.8) Antivirais.....	27
1.9) Baicalina e Baicaleína.....	29
1.10) Peptídeo AH-D.....	29
1.11) DFMA.....	30
1.12) Vírus da hepatite murina (MHV).....	30
2. Objetivo geral	32
2.1. Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos	33
3.1. Vírus.....	33
3.2 Cultura celular e padronização dos testes <i>in vitro</i>	33
3.2.1 Testes <i>in vitro</i> com o MHV.....	34
3.2.2 Testes em <i>in vitro</i> SARS-CoV-2.....	35
3.3 MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina).....	36
3.4 LDH (lactato desidrogenase).....	37
3.5 Infecção de animais da linhagem C57/BL6j.....	37
3.6 Tratamento e análises.....	38
3.7 Titulação viral.....	41
3.8 Quantificação de RNA viral do MHV e SARS-CoV-2 por qPCR.....	42
3.9 Análises hematológicas.....	42
3.10 Avaliação histológica.....	42
3.11 imuno-histoquímica.....	43

3.12 Análises estatísticas	43
4. Resultados	44
4.1 Padronização da infecção pelo MHV-3 e MHV-A59 em células L929	44
4.2 Avaliação do potencial antiviral da Baicalina e Baicaleína contra o MHV-3.45	
4.3 Avaliação do potencial antiviral do peptídeo AH-D contra o MHV-3 e SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	48
4.4 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-3/MHV-A59 <i>in vitro</i>	50
4.5 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	54
4.6 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-3 <i>in vivo</i>	55
4.7 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-A59	61
4.8 Avaliação da capacidade antiviral do DFMA contra o SARS-CoV-2 em camundongos K18hACE2.....	65
5. Discussão	69
7. Referências Bibliográficas	77
Anexo 1. CEUA aprovado	95
Anexo 2. Artigo finalizado submetido.	97
Anexo 3. Anexo das capas de artigos publicados que pude fazer parte durante o período do meu doutoramento.	124
Anexo 4. Artigos publicados durante o meu doutoramento em que fui primeiro ou segundo autor, referente ao trabalho executado durante o Mestrado.....	130
Anexo 4. Resultados obtidos em colaboração	131

1. Introdução.

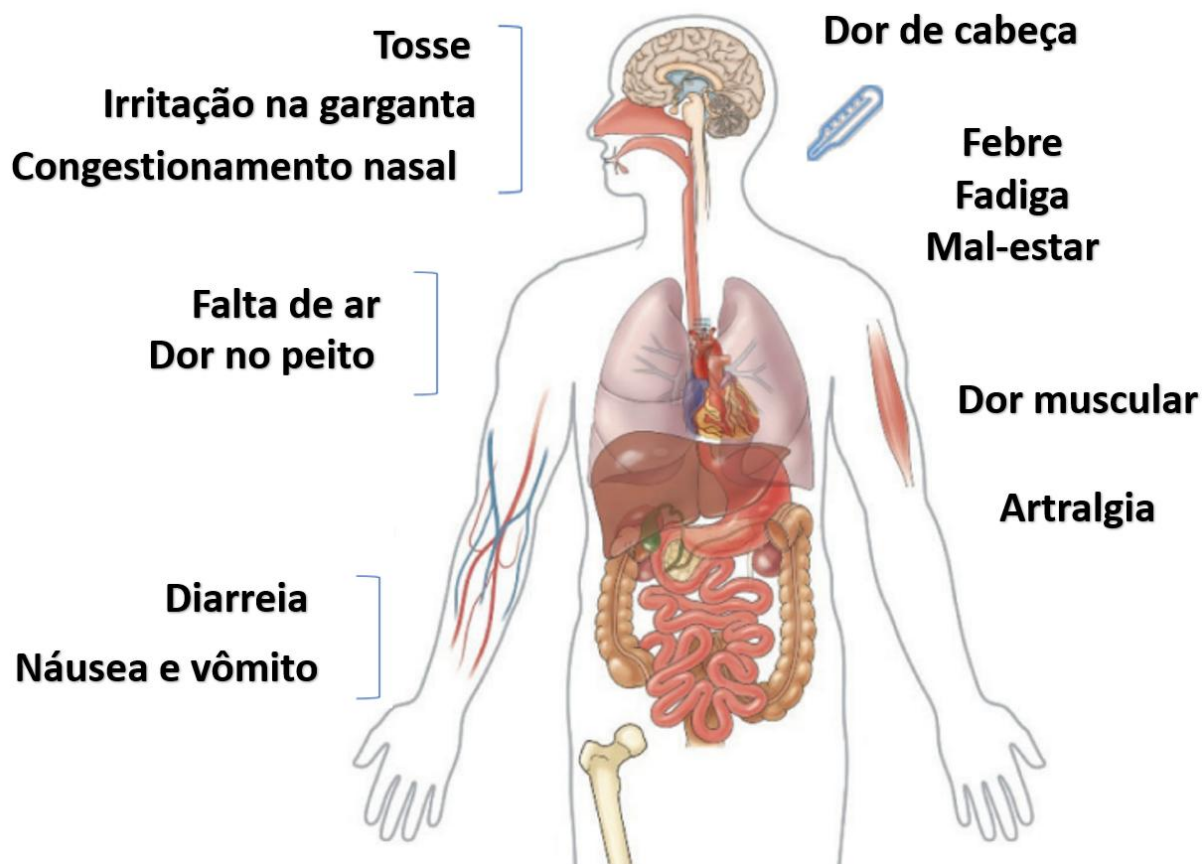
A família *Coronaviridae* é composta por vírus envelopados, de RNA fita simples senso positivo, possuindo partículas virais com o tamanho de 80 a 120 nm (Weiss & Navas-Martin 2005). Existem membros da família *Coronaviridae* capazes de infectar humanos, aves, roedores e outras espécies de animais (Su et al., 2016). Alguns coronavírus são globalmente distribuídos e capazes de causar infecções respiratórias leves em humanos, como é o caso dos vírus 229E, OC43, NL63 e HKU1 (Su et al., 2016). Além de infecções leves, os coronavírus já foram também protagonistas de importantes epidemias responsáveis pelo desenvolvimento de complicações respiratórias nos últimos 20 anos, sendo elas: I) a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS - *severe acute respiratory syndrome*) causada pelo SARS-CoV, responsável por 774 óbitos e 8098 casos até dezembro de 2003 (WHO, 2003), e que resultou em fortes impactos econômicos, sociais e na saúde (Qiu et al., 2018). II) A Síndrome respiratória do Oriente Médio causada pelo MERS-CoV, responsável por 943 mortes, sendo a maioria dos casos reportados na Arabia Saudita (WHO, atualizado em maio de 2024), e 2613 infecções reportadas ao total em 27 países. III) mais recentemente, no ano de 2019, a COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2. Este vírus emergiu em Wuhan, capital da província de Hubei, na China e logo em 11 de março de 2020 foi caracterizado pela OMS, o agente etiológico de uma pandemia. A pandemia da COVID-19 alcançou impactos devastadores, chegando a mais de 7 milhões de mortes e ultrapassando 750 milhões de casos confirmados no mundo, sendo somente no Brasil, mais de 700 mil mortes, somando mais de 37 milhões casos reportados da doença (WHO, 2024 [acesso em 21/09/2024]).

1.1) Sintomas.

A COVID-19 leva a sintomas agudos (Fig. 1) como febre, perda de olfato (anosmia) e paladar (disgeusia), cansaço, tosse seca, dor de cabeça, congestão nasal, dor de garganta, dores musculares e dores articulares, sintomas gastrointestinais e falta de ar, além de alterações mentais e baixa saturação de oxigênio em casos mais graves (Kim et al., 2020; X. Yang et al., 2020; Zhou, M; Zhang, M; Qu, 2020). A progressão da doença, em alguns casos mais graves, pode chegar a um estado de **Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG)**, podendo evoluir a óbito. Alguns fatores são considerados de risco para a COVID-19, a exemplo idade avançada e a presença de comorbidades associadas, como

hipertensão, obesidade, diabetes, além de doenças cardiovasculares (Fang et al., 2020; D. Wang et al., 2020; Z. Wu & McGoogan, 2020; Zhou et al., 2020).

Figura 1. Imagem demonstrativa dos sintomas agudos relacionados à COVID-19.
 Figura modificada de J. Li & Fan (2020).

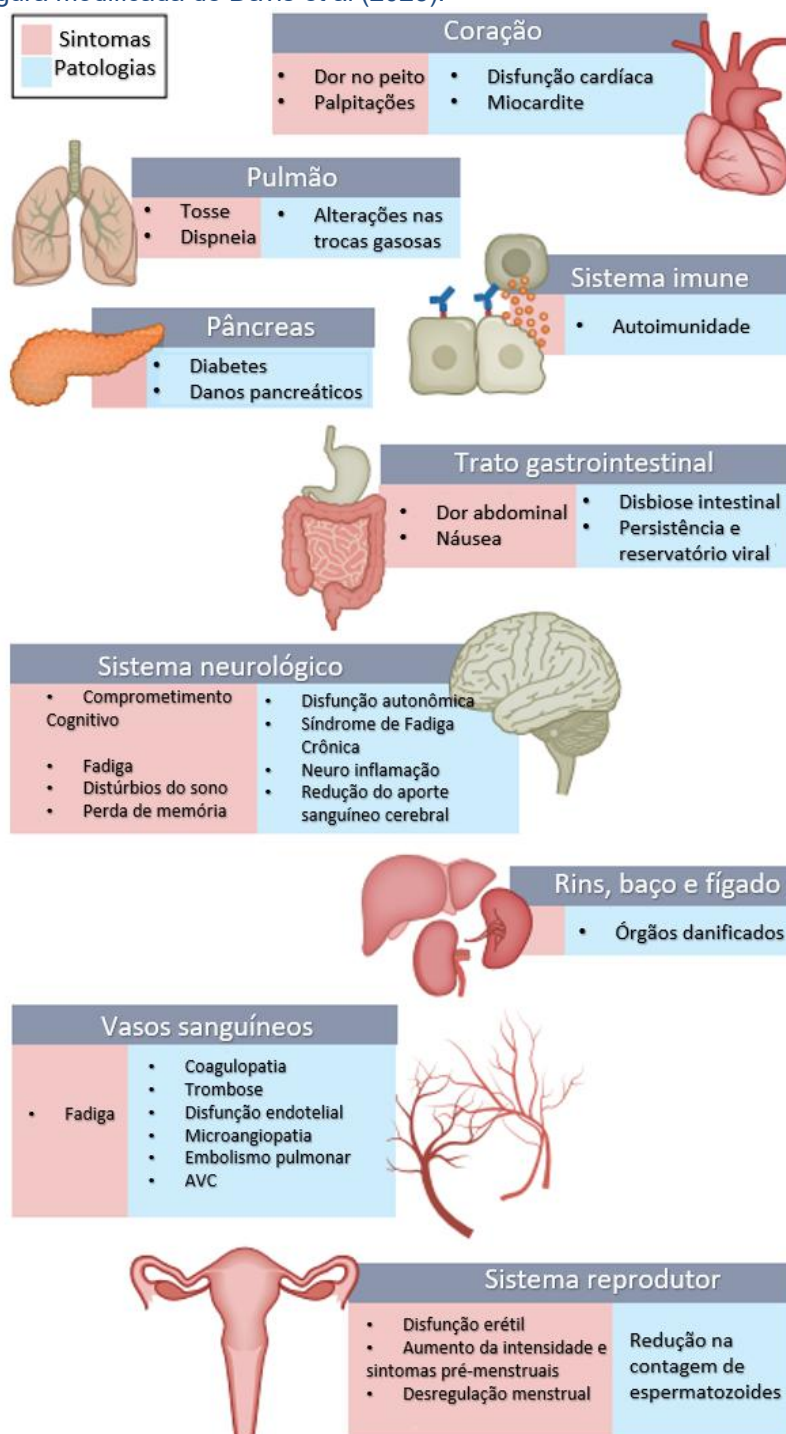


Os sintomas agudos da COVID-19 não são os únicos fatores preocupantes dessa síndrome. Existe ainda, o que vem sendo chamado de COVID longa, uma síndrome multissistêmica e heterogênea caracterizada por diversas alterações sistêmicas prolongadas que vão além dos acometimentos pulmonares agudos inicialmente reportados (Fig. 2). Ainda nos primeiros anos da pandemia, estudos demonstraram que os sintomas e as consequências associadas à infecção pelo SARS-CoV-2 podem perdurar por meses, podendo ainda gerar sequelas irreversíveis e irreparáveis (Paneroni et al., 2021; Puntmann et al., 2020; Truffaut et al., 2021; Zhao et al., 2020). Mais recentemente, foi demonstrado que os efeitos da COVID longa são capazes de gerar consequências e até mesmo sequelas no sistema cardiovascular (Xie et al., 2022), neurológico (Monje & Iwasaki, 2022), respiratório (Littlefield et al., 2022; Bull-Ottersen et al., 2022), reprodutor (Pollack B et al., 2023) e digestório (Meringer H & Mehandru S, 2022; Davis et al., 2023). Além de todos os acometimentos causados

individualmente pela infecção, a pandemia de COVID-19 foi capaz de apresentar sérios colapsos coletivos aos sistemas de saúde e impactos socioeconômicos consideráveis em diferentes países (Nicola *et al.*, 2020).

Figura 2. Figura demonstrativa de acometimentos causados pela Long COVID-19 que afetam diferentes sistemas e órgãos.

Figura modificada de Davis et al (2023).



1.2) Transmissão e variantes

A transmissão do SARS-CoV-2 se dá através do contato com gotículas respiratórias e aerossóis liberados por um indivíduo infectado na fase aguda da doença. Em menor

extensão, a transmissão pode ocorrer por contato com superfícies contaminadas (WHO, 2020; Madabhavi, Sarkar, & Kadakol, 2020). A taxa de transmissão da COVID-19 pode variar conforme as medidas de contenção adotadas e a variante circulante, porém é frequentemente subestimada, devido ao grande número de indivíduos infectados que não manifestam sintomas, já havendo sido demonstrado uma alta carga viral em dias iniciais a infecção com a possibilidade de transmissão do SARS-CoV-2 por indivíduos assintomáticos e pré-sintomáticos (He et al., 2020; Jefferson et al., 2022; Nishiura et al., 2020).

Não somente devido à alta capacidade de transmissão do vírus, há quatro anos, o SARS-CoV-2 circula de forma global, provocando infecções recorrentes. No entanto, a interação entre o vírus e os seres humanos ainda é recente e continuamente resulta em novas características selecionadas, refletindo o processo de evolução e adaptação de novas variantes a um hospedeiro diferente. Este fator reflete e gera preocupações, uma vez que, com o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2, foi observado um aumento progressivo da transmissibilidade do vírus (Carabelli et al., 2023; Liu et al., 2022; Campbell et al., 2021).

A alta transmissão do SARS-CoV-2 em diversos períodos resultou no surgimento independente de novas variantes em diferentes partes do mundo com grande importância clínica e epidemiológica, como foi o caso das variantes Alfa (Davies NG et al., 2021), Gama (Faria NR et al., 2021) e Delta (Dhar MS et al., 2021), que emergiram respectivamente na Inglaterra, Brasil e Índia, resultando em um acúmulo de mutações que influenciavam diretamente o fitness viral. Posteriormente, emergiu a variante Ômicron, seguida pelo surgimento contínuo de novas subvariantes que se sucederam ao longo do tempo, demonstrando não só maior transmissibilidade, como maior escape imunológico (Rössler et al., 2021; Viana et al., 2022), que será discutido de forma mais abrangente nas próximas seções.

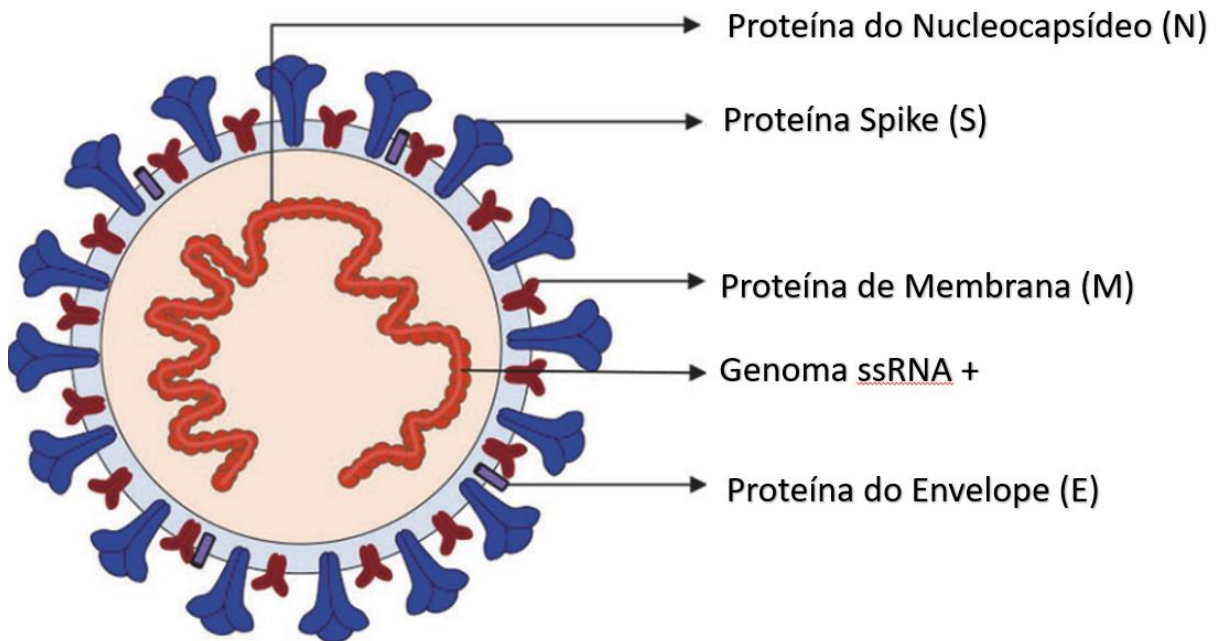
1.3) Estrutura Viral.

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de RNA fita simples senso positivo, com ~29.8kb (A. Wu et al., 2020). Seu genoma apresenta uma região Cap na extremidade 5', é poliadenilado com ao menos 13 janelas abertas de leitura (ORFs), capazes de codificar 16 proteínas não estruturais já descritas, 4 proteínas estruturais (Fig. 3): spike

(S); do envelope (E), de membrana (M) e do nucleocapsídeo (N) e ao menos 8 proteínas acessórias (Steiner et al., 2024).

Figura 3. Partícula viral do vírus SARS-CoV-2, apontando suas proteínas estruturais do nucleocapsídeo (N), proteína Spike (S), proteína M e proteína do envelope (E).

Figura modificada de Zhang et al., (2021).



1.4) Ciclo de replicação viral.

A adsorção do vírus na célula hospedeira se dá pela ligação da glicoproteína Spike (S) ao receptor celular ECA2 (Enzima conversora da angiotensina 2), de maneira similar ao SARS-CoV (Walls et al., 2020) (Fig. 4A). Estudos realizados no início da pandemia demonstraram a expressão de ECA2 em diferentes tecidos, a exemplo do pulmão, intestino, rins e testículo (M. Y. Li et al., 2020), possibilitando e sendo comprovado posteriormente uma variedade de possibilidades de efeitos sistêmicos e prolongados associados à infecção por SARS-CoV-2 no hospedeiro (Xie et al., 2022; Monje & Iwasaki, 2022; Davis et al., 2023).

Após a adsorção viral, a entrada do nucleocapsídeo viral pode ocorrer de duas formas: i) por via endossomal, em que o genoma viral só é liberado no citoplasma celular após a

acidificação do endossomo e posterior fusão da membrana endossomal com o envelope viral; ii) com o auxílio de uma serino-protease celular TMPRSS2, capaz de auxiliar a clivagem da proteína S, que funcionará não só como um ligante ao receptor celular, mas também no processo de fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula (Fig. 4A) (Hoffmann et al., 2020). A proteína S possui dois sítios de clivagem, sendo o primeiro entre as porções S1 e S2 da proteína S e um outro sítio de clivagem na região S2 que mediará os eventos de fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular (Hoffmann et al., 2020).

Após a entrada e liberação do RNA viral no citoplasma celular, é iniciado a produção de proteínas não estruturais importantes no processo de replicação do material genético viral. Se tratando de um vírus de RNA senso positivo, as ORF1a e ORF1b iniciam o processo de tradução através dos ribossomos celulares. A região 5' do genoma viral, por possuir uma região CAP, funciona como um sítio de ligação ribossomal e iniciação do processo de tradução, em que é produzida a poliproteína A e poliproteína AB, que serão posteriormente clivadas por conservadas enzimas proteolíticas nsp3 e nsp5, dando origem às 16 proteínas não estruturais do SARS-CoV-2 (Báez-santos et al., 2015; Lei et al., 2018; Scott et al., 2022) (Fig. 4B). Durante o processo de tradução dessas regiões do genoma viral, o ribossomo é capaz de traduzir toda a ORF1a e, através de um processo denominado PRF (*Programmed Ribosomal Frameshifting*) seguir a tradução para ORF1b. O PRF é um deslocamento programado do ribossomo e ocorre quando o ribossomo chega em uma região específica ao final da ORF1a e isso faz com que ele volte um nucleotídeo e siga o processo de tradução em seguida, podendo vir a ser um alvo para inibição da replicação viral (Bhatt et al., 2021), gerando um conteúdo proteico diferente chamado ORF1ab, que consiste nas nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5, nsp6, nsp7, nsp8, nsp9, nsp10, nsp12, nsp13, nsp14, nsp15 e nsp16 (Fig. 4B).

Essas proteínas são necessárias para o início do processo de replicação do material genético viral, dentre elas, proteínas associadas à formação do complexo de replicação que se formam em vesículas de dupla membrana (Fig. 4 B), além de proteínas capazes de modular e interromper o processo de tradução de mRNA da célula hospedeira, como é o caso da nsp1 (Schubert K et al., 2020). Os complexos de replicação envolvem a formação de e reorganização das membranas do RE, levando a formação de uma vesícula de membrana dupla, mediada por proteínas não estruturais (Roingeard et al., 2022). Dentro dos complexos de replicação a polimerase viral RNA dependente RdRp (nsp12)

irá sintetizar novas fitas de RNA genômico e subgenômico a partir de uma fita molde de RNA senso negativo (Roingeard et al., 2022) (Fig. 4A).

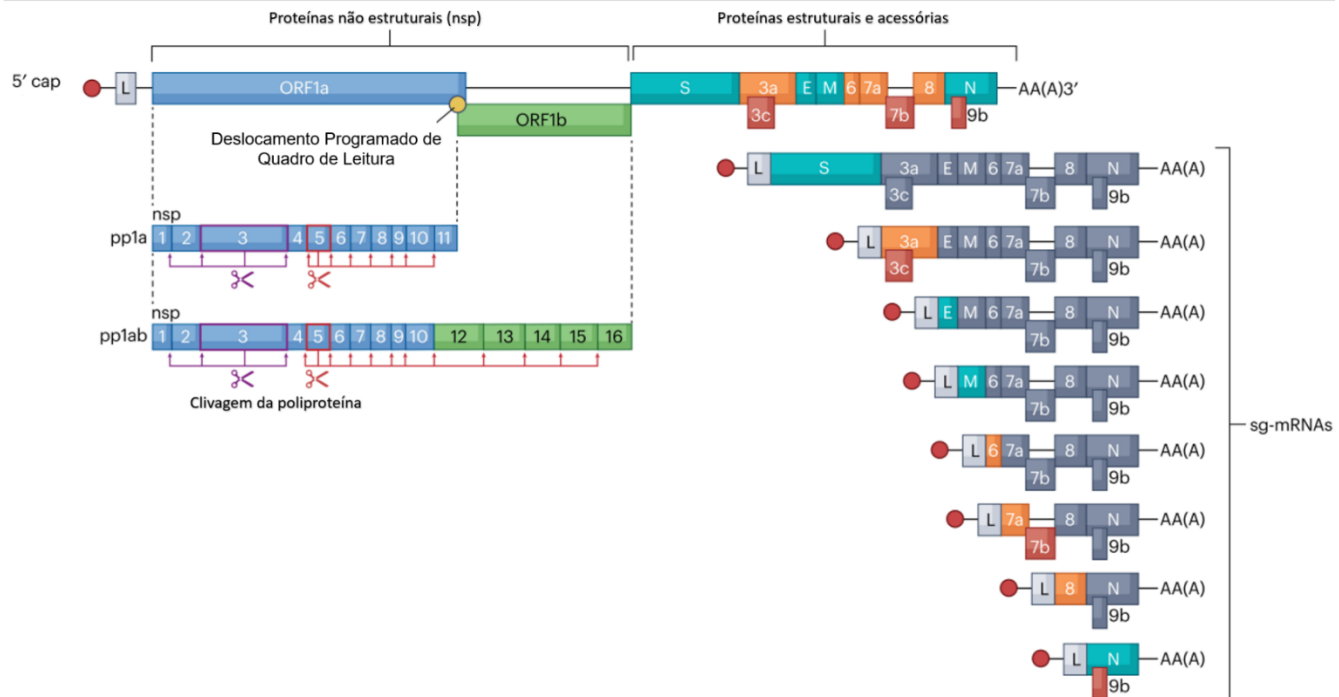
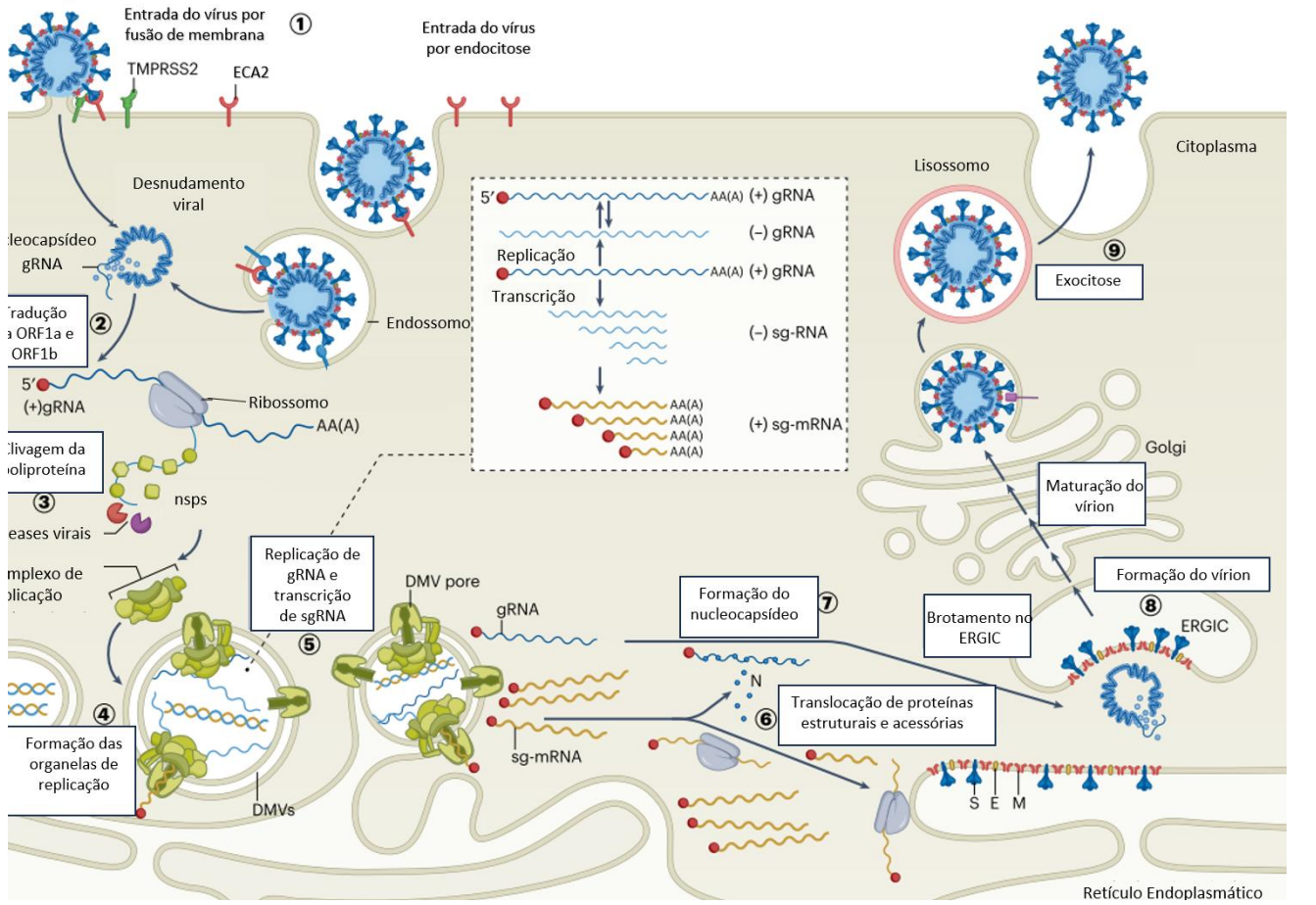
Diferentes proteínas não estruturais desempenham funções primordiais na formação do complexo de replicação e evasão imune (Fung et al., 2022; Kumar et al., 2021). Todo o processo de tradução dessas proteínas é orquestrado e regulado pelas ORFs 1a e 1b, porém, existe ainda uma terceira porção do genoma viral que codifica, através de RNAs subgenômico, a produção de proteínas estruturais e acessórias (A. Wu et al., 2020) (Fig. 4B). Os RNAs subgenômico são fragmentos menores de RNA viral capazes de codificar proteínas estruturais e acessórias a serem produzidas de forma pouco mais tardia quando comparada às proteínas inicialmente sintetizadas (Isabel et al., 2005). Os RNAs subgenômico também possuem uma região UTR, o que funcionará como iniciador para ligação ribossomal e produção dessas proteínas estruturais e acessórias (Y. Yang et al., 2009).

Os RNAs genômicos são então exportados e interagem com a proteína N, formando o nucleocapsídeo, que posteriormente, irá interagir com outras proteínas estruturais, que através de um sistema de transporte ERGIC (*endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment*), irão interagir, formando as partículas virais (Lu et al., 2021) (Fig. 4A). As partículas virais maduras são então carregadas pelo Golgi e deixam a célula via exocitose lisossomal (D. Chen et al., 2021).

Figura 4. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2 com detalhamento do genoma viral.

Ciclo de replicação do SARS-CoV-2 com detalhamento do genoma viral. (A) Imagem representativa do processo de replicação do SARS-CoV-2, iniciando com a sua adsorção pela utilização do receptor ECA2. Após a adsorção, o nucleocapsídeo entra na célula e tem acesso ao citoplasma através da via endossomal, ou pela clivagem mediada por TMPRSS2, em que é iniciada a fusão de membrana. Após o acesso ao citoplasma celular, é iniciado a tradução das ORF1a e ORF1b, dando origem às poliproteínas que serão posteriormente clivadas, dando origem às proteínas não estruturais. As membranas do retículo endoplasmático são então remodeladas para formação das vesículas de membrana dupla, onde ocorrem a formação do complexo de replicação e as fábricas virais. Nestes locais, é produzido tanto mais gRNA, quanto sgRNA. O sgRNA será então traduzido para formação de proteínas estruturais e acessórias. Já no ERGIC, proteínas do nucleocapsídeo irão começar a interagir com o gRNA, gerando o início da formação de novas partículas virais. Por fim, partículas virais maduras saem da célula por exocitose. (B) Imagem representando o RNA genômico do SARS-CoV-2, destacando as ORFs responsáveis pela codificação de proteínas não estruturais, bem como proteínas estruturais e acessórias. Além disso, são evidenciadas as duas poliproteínas resultantes da tradução das ORF1a e ORF1b, com a indicação das zonas de clivagem das poliproteínas. A imagem também

apresenta as possibilidades de formação dos sgRNAs, que originam as proteínas acessórias e estruturais. Modificado de (Steiner et al., 2024).



1.5) Vacinas.

Ainda em 2020 iniciou-se uma intensa corrida para o desenvolvimento e disponibilização de uma vacina que impedisse ou atenuasse o desenvolvimento das manifestações graves associadas à COVID-19. Atualmente, existem diversas vacinas aprovadas e em fase de desenvolvimento para a COVID-19, porém, um fator de preocupação é a velocidade do surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2. Diversas vacinas baseadas na proteína Spike viral foram e continuam sendo desenvolvidas com uma grande capacidade de gerar uma robusta resposta e memória imunológica contra o vírus (Zheng et al., 2021). No entanto, as variantes em circulação acumulam mutações nas porções da região do domínio de ligação ao receptor (*Receptor-Binding Domain* - RBD) da proteína S viral, muito importante no processo de geração da resposta imunológica adaptativa (Xin Zhao et al., 2022). Um exemplo prático são as evidências que demonstram um aumento progressivo do escape imunológico, especialmente associado às subvariantes da variante Ômicron (Willett et al., 2022; Xin Zhao et al., 2022).

Diversas variantes foram descritas e apresentaram mutações associadas à evasão imune com relação às vacinas em uso e infecções prévias com o vírus (Cromer et al., 2022; R. Li et al., 2021; Rössler et al., 2021; Viana et al., 2022; P. Wang et al., 2021). Sabendo disso, a busca por outras alternativas vacinais e terapêuticas que visem conter e/ou amenizar os casos de COVID-19, como o uso de terapias com anticorpos monoclonais e drogas antivirais, que atuam na diminuição dos títulos virais em pacientes infectados, se faz necessária.

1.6) Anticorpos monoclonais

Diversos anticorpos monoclonais (mAbs) com especificidade para SARS-CoV-2 foram gerados e chegaram a ser usados clinicamente (Hwang et al., 2022). No entanto, a maioria dos mAbs clinicamente aprovados tornaram-se obsoletos após o surgimento da variante Ômicron, que carrega alterações em epítomos importantes que são utilizados como alvos de anticorpos monoclonais previamente utilizados (Viana et al., 2022). A variante ômicron apresenta um alto nível de escape para anticorpos previamente considerados neutralizantes direcionados à região RBD da proteína

Spike (Cao et al., 2022), semelhante ao previamente mencionado para as vacinas. Como resultado, medicamentos baseados em anticorpos monoclonais (mAbs) mostraram uma redução significativa na eficácia de neutralização (Cao et al., 2022).

1.7) Tempestade de citocinas e abordagens terapêuticas.

Assim como em outras infecções virais, a patogênese da COVID-19 está associada a fatores virais e do hospedeiro. Já foi demonstrado para outros coronavírus humanos, uma correlação positiva entre a gravidade da doença e os elevados títulos virais nestes indivíduos (Channappanavar & Perlman 2017). No caso da COVID-19, isso não é diferente, uma vez que a carga viral presente no soro de pacientes graves pode ser considerada um excelente biomarcador de maior gravidade da doença, estando também relacionadas a níveis elevados de citocinas inflamatórias e marcadores de danos teciduais (Bauer et al., 2023). Dessa forma, o controle da carga viral parece importante para mitigar ou minimizar o desenvolvimento da doença grave.

Desde o início da emergência do SARS-CoV-2, associados a altas cargas virais encontradas em pacientes, níveis séricos aumentados de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas IL1- β , IFN γ , CXCL10, e CCL2 foram reportadas em pacientes infectados. Ainda, pacientes graves (hospitalizados e em UTI) apresentaram maiores concentrações séricas de das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-7, IFN- γ IL-10, além de G-CSF e das quimicinas CXCL10, CCL3, CCL2 e TNF quando comparados a pacientes infectados e que não necessitavam de terapia intensiva, sugerindo que a infecção grave induzida pelo SARS-CoV-2 está associada a um quadro de inflamação exacerbada caracterizada por uma tempestade de citocinas similar a apresentada em outras coronaviruses humanas (Huang et al., 2020; Montazersaheb et al., 2022).

Atualmente, a tempestade de citocinas é considerada um fator chave para o agravamento de um paciente acometido pela COVID-19. Este evento é caracterizado por uma produção aguda e liberação desordenada de diversos marcadores envolvidos na resposta inflamatória que atingem níveis sistêmicos, podendo levar a um quadro de falência múltipla de órgãos além dos pulmões como cérebro, coração, fígado e rins (Chou et al., 2021; J. Li & Fan, 2020; Monje & Iwasaki, 2022; Montazersaheb et al., 2022).

Sendo assim, terapias imunomoduladoras vêm sendo testadas e implementadas desde o início da pandemia de COVID-19 como terapia coadjuvante na tentativa de controlar essa inflamação exacerbada. Neste sentido, alguns exemplos de estratégias utilizadas no tratamento são os corticoides que vieram como uma alternativa clínica e apresentaram eficácia no tratamento (The Recovery Collaborative Group, 2021). Já foi demonstrado em modelo experimental que o uso de corticoide pode melhorar parâmetros clínicos frente a infecção por SARS-CoV-2 em hamster, porém causando um aumento significativo da carga viral (Ye et al., 2021). O uso de um antiviral análogo de nucleosídeo foi capaz de reduzir a carga viral induzida pelo uso de corticoide, sugerindo um tratamento concomitante dos dois medicamentos e a importância do controle da replicação viral (Ye et al., 2021).

Outra estratégia é a utilização de medicamentos com efeitos pró-resolutivos. Já foi demonstrado que um agonista dos receptores de melanocortina, com efeitos pró-resolutivos/ anti-inflamatórios, foi capaz de diminuir a inflamação pulmonar em camundongos infectados com o MHV-A59 ou SARS-CoV-2 e diminuir mediadores pró-inflamatórios produzidos por PBMCs humanos infectados com SARS-CoV-2. Além disso, o composto apresentou efeitos benéficos em estudos clínicos diminuindo o tempo de recuperação do trato respiratório (Almeida, PRJ et al., 2024).

Além disso, antagonistas de receptores de interleucinas como IL-1 (Huet et al., 2020), IL-6 (Shankar-Hari M et al., 2021) e inibidores de TNF (Gianfrancesco et al., 2020) também apresentaram eficácia no tratamento de pacientes com COVID-19. Outros medicamentos previamente utilizados em doenças autoimunes, como o inibidor das Janus Kinase (JAK) 1 e 2, também apresentaram efeitos benéficos em modelos experimentais utilizando macacos rhesus infectados com SARS-CoV-2 (Hoang et al., 2020), tendo mais uma vez o seu efeito potencializado com o uso concomitante de um antiviral análogo de nucleosídeo em um estudo em humanos (Kalil et al., 2021).

1.8) Antivirais

Atualmente, existem três medicamentos antivirais aprovados pelo *US Food and Drug Administration (FDA)* (Centers for Disease Control and Prevention, 2024) para o tratamento da COVID-19. São eles:

- i) Paxlovid (Nirmatrelvir juntamente com o Ritonavir): O Paxlovid é um medicamento no qual os princípios ativos atuam através do efeito sinérgico de dois compostos, sendo um deles o Nirmatrelvir, capaz de inibir a protease 3CL (nsp5) do vírus SARS-CoV-2, não permitindo que essa enzima consiga clivar a poliproteína viral e dar origem às proteínas não estruturais. O outro princípio ativo do Paxlovid é o ritonavir, que atua inativando a enzima CYP3A4, uma importante enzima capaz de metabolizar medicamentos (Sevrioukova & Poulos, 2010). O resultado da combinação dos dois princípios ativos é um antiviral com farmacocinética aprimorada, com sua eficácia terapêutica potencializada (Owen et al., 2021).
O medicamento é indicado para adultos e crianças acima de 12 anos e uma grande vantagem é sua via de administração oral (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).
- ii) Veklury (Remdesivir): O Remdesivir é um antiviral administrado em forma de pró-droga que age impedindo a formação do RNA viral, pela sua ligação à RNA polimerase dependente de RNA (Brown et al., 2019; Wang et al., 2020).
Uma grande desvantagem do uso do Veklury é a administração, pois acontece exclusivamente em ambiente hospitalar, uma vez que o medicamento usualmente é aplicado por via intravenosa, por três dias consecutivos (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).
Já foi demonstrado que pacientes imunocomprometidos podem ter o *clearance* viral prejudicado, gerando longos períodos de infecção (Hogan et al., 2023).
Em infecções prolongadas tratadas com Remdesivir, já foi demonstrada a ocorrência de mutações na RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Gandhi et al., 2022)(Martinot et al., 2021), que resultaram em alterações combinadas que limitam a eficácia clínica do fármaco (Hogan et al., 2023), o que gera preocupações para a seleção de mutantes resistentes ao fármaco.
- iii) Lagevrio (Molnupiravir): O Molnupiravir é uma forma do composto N4-hidroxicitidina (NHC), administrado em forma de pró-droga. O NHC é um análogo de nucleosídeo capaz de ser incorporado no RNA viral pela RdRp viral, gerando um acúmulo de mutações deletérias ao vírus que inviabilizam a

partícula viral (Mahase, 2021; MERK, 2021; Toots et al., 2020; Urakova et al., 2018).

Assim como o Nirmatrelvir, uma grande vantagem do Molnupiravir é sua via de administração oral (Centers for Disease Control and Prevention, 2024).

Diante da carência de medicamentos, é fato que a busca por potenciais drogas com atividade antiviral é de extrema importância para o controle ou amenização dos casos de COVID-19, seja isoladamente ou em associação com drogas imunomoduladoras como já discutido. ***Nossa hipótese de trabalho é que a administração de fármacos com ação antiviral aplicadas dentro da janela terapêutica adequada, poderiam contribuir para o controle da carga viral e redução significativa do dano tecidual induzido pelo SARS-CoV-2. O conjunto destes efeitos traria uma melhora da pneumonia e demais acometimentos clínicos induzidos pelo SARS-CoV-2.***

Neste trabalho buscamos avaliar a ação de potenciais candidatos antivirais (reposicionamento de drogas) *in vitro* e *in vivo*.

1.9) Baicalina e Baicaleína.

O primeiro alvo de nosso estudo foi o composto Baicalina, um flavonóide metabólito da Baicaleína originalmente isolado de *Scutellaria baicalensis*, uma planta medicinal chinesa. Este metabólito apresentou potencial antiviral contra outros vírus envelopados como o DENV-2 (Moghaddam et al., 2014), Chikungunya (Oo et al., 2018) e até mesmo contra o coronavírus SARS-CoV (F. Chen et al., 2004), já tendo sido demonstrado por Moghaddam e colaboradores (2014) a sua atividade no processo de adsorção viral. Desta forma, consideramos que a Baicalina e a Baicaleína seriam importantes candidatos antivirais a ser testados contra outros coronavírus.

1.10) Peptídeo AH-D.

Outro potencial composto antiviral testado foi o peptídeo de 27aa AH-D, um peptídeo com efeito virucida, em que já foi previamente demonstrado pelo nosso grupo, em parceria com a *Nanyang Technological University of Singapore* (NTU), uma baixa toxicidade em células de mamífero, além de promissores efeitos *in vitro* contra diversos membros da família *Flaviviridae*. O peptídeo AH-D também apresentou potentes efeitos antivirais quando

administrado em esquema terapêutico utilizando um modelo *in vivo* de infecção pelo ZIKV (Camargos et al., 2019; Jackman, Shi, et al., 2018). O mecanismo de ação do AH-D se dá pela ruptura do envelope de partículas virais de alta curvatura, ou seja, de tamanho menor que 300nm. Dessa forma, sugerimos que o peptídeo AH-D poderia vir a ser um potencial agente antiviral contra os vírus da família *Coronaviridae*, dado as características estruturais das partículas virais dessa família.

1.11) DFMA.

O terceiro candidato avaliado foi o análogo de nucleosídeo 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine (DFMA). Seu mecanismo e ação se dá pela ligação análoga ao sítio ativo da enzima RdRp viral, tornando-a incapaz de desempenhar sua função de replicação do material genético viral. Estudos já demonstraram que o DFMA demonstrou uma potente atividade antiviral, diminuindo a detecção do genoma viral *in vitro* contra DENV e JEV e *in vivo* contra DENV-2 (Zandi et al., 2019). Além disso já foi demonstrado a capacidade *in vitro* e *in vivo* do DFMA frente a infecção por ZIKV, em que o análogo de nucleosídeo não só reduziu a carga viral no cérebro de animais infectados, mas também esteve associado a redução da neuro-inflamação induzida pela infecção (Del Sarto et al., 2020). Dado o mecanismo de ação do DFMA, é possível pressupor que o análogo de nucleosídeos poderia apresentar um efeito de redução da carga viral contra membros da família *Coronaviridae*, uma vez que são vírus também de RNA fita simples, senso positivo.

1.12) Vírus da hepatite murina (MHV).

A necessidade de uma plataforma para avaliar potenciais drogas e agentes antivirais contra coronavírus foi uma alta prioridade no início da pandemia. Inicialmente, o *screening* das moléculas de interesse foi realizado em ambiente de biossegurança 2 (NB2) pela utilização de um ou dois betacoronavirus murinos (MHV-3 e MHV-A59). O vírus da hepatite murina (MHV), é um vírus naturalmente conhecido por infectar camundongos, e assim como o SARS-CoV-2, é um betacoronavirus com potencial letal (Lucchiari et al., 1992) que, apesar de ser conhecido previamente como um vírus hepatotrópico, foi proposto como uma ótima ferramenta e modelo experimental para estudar doenças pulmonares induzidas por coronavírus em ambiente NB2 (Z. Yang et al., 2014; Andrade et al., 2021;

Campolina-Silva et al 2023). O MHV-3 é um importante modelo de COVID aguda mais grave mais recentemente utilizado como modelo para teste de potenciais alvos terapêuticos (Andrade et al., 2021; Campolina-Silva et al., 2023; Lima et al., 2024; Oliveira et al., 2024; J. C. Pimenta et al., 2024; Z. Yang et al., 2014). O MHV-3, quando administrado por via intranasal, é capaz de induzir danos pulmonares similares à COVID em camundongos, incluindo edema alveolar, hemorragia, trombos de fibrina e alterações fisiológicas na mecânica respiratória de animais infectados, sugerindo uma disfunção pulmonar, além apresentar uma carga viral significativa após 3 dias (Andrade et al., 2021). Isso reforça a possibilidade de vir a ser um importante modelo para testes de potenciais antivirais contra coronavírus.

Além do modelo de COVID grave com o MHV-3, o MHV-A59 também vem sendo utilizado como um modelo de COVID leve, de caráter auto-resolutivo, em que também é possível detectar uma alta carga viral no pulmão de animais infectados após dois dias de infecção (J. C. Pimenta et al., 2024). Além disso, o MHV-A59 é capaz de levar a alterações neurológicas e comportamentais prolongadas, comumente observadas em pacientes com sintomas relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2, o que torna o modelo similar à COVID longa (J. C. Pimenta et al., 2024).

2. Objetivo geral

Realizar um *screening* de candidatos antivirais contra a infecção por coronavírus.

2.1. Objetivos específicos

I- Padronizar a infecção pelos coronavírus murino (vírus MHV-3 e MHV-A59) em células da linhagem L929.

II. Avaliar a viabilidade celular e potencial atividade antiviral de diferentes moléculas contra os vírus MHV-3/MHV-A59 *in vitro*, sendo eles:

- Baicalina e Baicaleína, inibidores de entrada viral.
- AH-D, capaz de romper partículas virais extracelulares.
- DFMA, análogo de nucleosídeo.

III. Avaliar o potencial antiviral dos compostos mais promissores em II, contra o vírus SARS-CoV-2 *in vitro*.

IV. Avaliar o potencial antiviral do composto mais promissor do item III *in vivo* utilizando um modelo que mimetiza a COVID aguda grave, pelo uso do MHV-3;

V. Avaliar o potencial antiviral do composto selecionado no item III *in vivo*, utilizando um modelo de COVID leve e auto-resolutiva, pelo uso do MHV-A59;

VI. Validar o potencial antiviral do melhor composto selecionado *in vivo* em IV e V contra o vírus SARS-CoV-2 pelo uso de camundongos transgênicos K18hACE2.

3. Material e Métodos.

3.1. Vírus

O vírus da hepatite murina amostra MHV-3 foi cedido e sequenciado (acesso GenBank no. MW620427.1) por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil). A amostra A59 (MHV-A59) ATCC (ATCC VR-764 – disponível em <https://www.atcc.org/products/all/VR-764.aspx>) foi adquirido, e propagado em células L929 (ATCC, CCL1) para geração dos estoques virais. A titulação por ensaio de placa foi realizada nesta mesma linhagem celular. Os estoques virais produzidos e titulados foram armazenados em freezer -80°C para utilizações posteriores. Além disso, o vírus SARS-CoV-2 (Wuhan Hu-1 amostra SP02BRA) foi gentilmente concedido pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon (GenBank número de acesso MT350282) e utilizado em experimentos *in vitro* que foram realizados em contingenciamento NB3 em parceria com o Laboratório LANAGRO e Laboratório de Nível de Biossegurança 3 – NB3 - ICB UFMG. Experimentos *in vivo* utilizando o SARS-CoV-2 foram realizados em parceria com o Laboratório de Nível de Biossegurança 3 – NB3 - ICB UFMG utilizando a variante gama (P.1; #EPI_ISL_1060902, hCoV-19/Brazil/AM-L70-71-CD1739/2020), isolada em células Vero E6 a partir de *swab* obtido de paciente com diagnóstico confirmado.

3.2 Cultura celular e padronização dos testes *in vitro*

Para os testes, os seguintes compostos descritos na tabela 1 foram testados:

Tabela 1: Compostos testados

Composto	Mecanismo antiviral proposto	Referencias
AH-D	Ruptura do envelope de partículas virais extracelulares.	(Jackman et al., 2018)
Baicalina e Baicaleína	Efeito anti-adsorção.	(Moghaddam et al., 2014)
7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine (DFMA)	Análogo de nucleosídeo	(Zandi et al., 2019).

Os peptídeos AH-D foram enviados pelo Prof. Nam-Joon Cho da Nanyang Technological University e o DFMA foi sintetizado no laboratório Schinazi na Emory University como previamente descrito (Zandi et al, 2019) com grau de pureza de 98%.

Células L929 (CCL1) foram cultivadas utilizando meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Cultilab, Campinas, Brasil) e células Vero (BCRJ 0245) utilizando o meio RPIMI (Cultilab, Campinas, Brasil). Em ambos os casos, os meios foram suplementados com 7% de soro fetal bovino (SFB). Além disso, células epiteliais pulmonares CALU-3 (BCRJ 0264 <http://bcrc.org.br/celula/0264>) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 20% soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos não essenciais, 2mM de L-glutamina, e 1mM de piruvato de sódio, além de antibióticos. Todas as células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Primeiramente, foi feita uma padronização para estabelecer a curva de crescimento do vírus MHV-3 e MHV-A59, em que células L929 foram plaqueadas, 5x10⁴ células L929 por poço, em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Após o período de incubação, as células foram infectadas pelo vírus MHV-3 ou MHV-A59 com 100 µL em diferentes MOI =1; 0,1; e 0,01. Foram coletados dados de MTT, LDH e titulação viral do sobrenadante celular após diferentes tempos (4hrs, 8hrs, 16hrs, 24hrs e 48hrs), conforme ilustrado (Fig. 5A), para definição de melhor tempo e MOI para realização posterior da triagem de potenciais antivirais.

3.2.1 Testes *in vitro* com o MHV

Após a padronização de tempo e MOI, cada composto foi testado sendo inoculado juntamente com o vírus na MOI de 0.01 em diferentes concentrações, conforme ilustrado (Fig. 5B), com exceção do peptídeo AH-D que foi incubado por 90 minutos juntamente com o inóculo viral previamente ao momento da infecção da monocamada de células, devido ao seu mecanismo proposto. Para todos os compostos, foi feita a titulação do sobrenadante celular após 16 horas do momento da infecção, além do ensaio de MTT e LDH na presença e ausência dos compostos, conforme previamente definido pela padronização. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para avaliação de título viral.

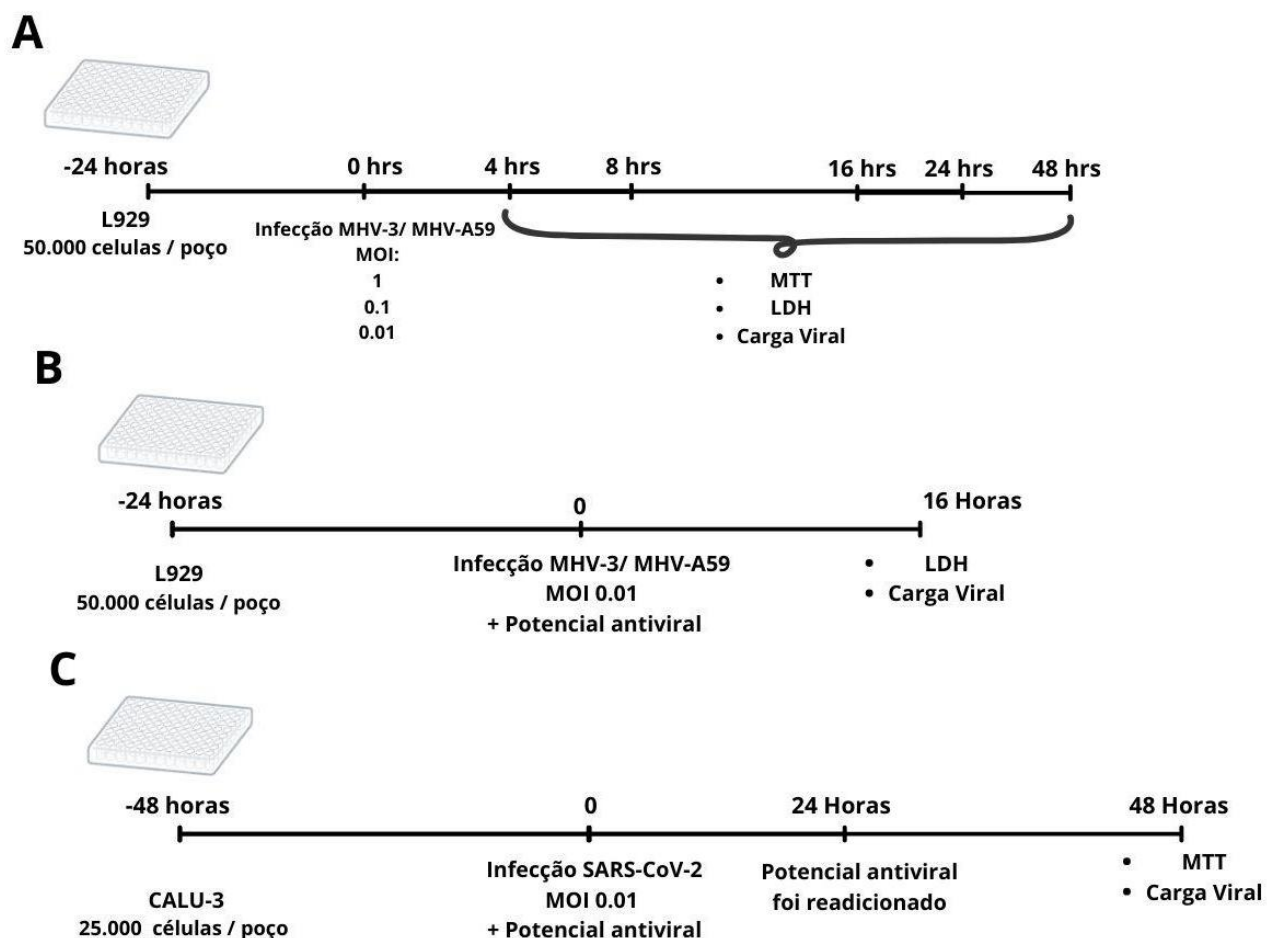
3.2.2 Testes em *in vitro* SARS-CoV-2

Para avaliar o potencial antiviral de diferentes compostos *in vitro* contra o SARS-CoV-2, dado a necessidade de um laboratório de biossegurança nível NB-3, experimentos foram realizados em parceria com o Laboratório LANAGRO, da rede de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária e posteriormente evoluídos para testes *in vivo*.

Para o teste em que utilizamos as células Calu-3, foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células por poço, em placas de 96 poços e incubadas por 48 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂. O teste de potencial antiviral do DFMA foi feito de maneira similar ao descrito para o vírus MHV. O análogo de nucleosídeos foi inoculado juntamente com o vírus SARS-CoV-2 (MOI=0.01), em diferentes concentrações e incubado a 37 °C e 5% CO₂ por 48 horas, sendo que ao final das primeiras 24 horas de incubação, o análogo de nucleosídeo foi adicionado novamente, conforme ilustrado (Fig. 5C). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para avaliação de título viral.

Figura 5. Padronização e protocolo experimental de infecção para testes de potenciais antivirais *in vitro*.

Padronização *in vitro* com testes de diferentes MOI, e tempos de análises para o vírus MHV-3 e MHV-A59, sendo coletado a cada período indicado. O sobrenadante das células infectadas foi coletado após os tempos de 4, 8, 16, 24 e 48 horas após a infecção de células L929. Além disso, foi feito MTT e LDH para acessar a viabilidade/ morte celular dentro das condições descritas **(A)**. Protocolo experimental de testes de potenciais antivirais contra os vírus MHV-3 e MHV-A59 em células L929, conforme os melhores parâmetros previamente definidos na padronização **(B)**. Protocolo experimental de testes de potenciais antivirais contra os vírus SARS-CoV-2 em células Calu-3 **(C)**.



3.3 MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)

O método de MTT foi utilizado com a finalidade de avaliar a viabilidade celular, na concentração de 0,5mg/mL diluído em PBS, a solução foi colocada sobre a célula e então incubada a 37 °C e 5% CO₂ por 2 horas. Após este período o sal formado pela reação do MTT foi dissolvido com a adição de 100 µL de DMSO e foi feita a leitura em um espectrofotômetro de placa na O.D. de 490nm.

3.4 LDH (lactato desidrogenase)

Para o ensaio de LDH foi utilizado um kit de cinética da Bioclin (Catálogo K014, Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), seguindo a metodologia indicada pelo fabricante, com modificações, em que o teste foi feito em 96 poços, e foi adicionado 4 µL do sobrenadante celular. Posteriormente, foi adicionado 200 µL da solução de trabalho do kit e realizada a leitura, logo em seguida a 340 nm. 3 leituras foram feitas com o intervalo entre as leituras de um minuto para cálculo de consumo do substrato por minuto. Os valores foram expressos em absorbância (Δ/min).

$$\Delta/\text{min} = [(\text{Abs. } 1^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 2^{\text{a}} \text{ leitura}) + (\text{Abs. } 3^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 4^{\text{a}} \text{ leitura})]$$

3.5 Infecção de animais da linhagem C57BL/6j

O composto que apresentou os resultados mais promissores nos testes *in vitro* foi inicialmente avaliado quanto à sua capacidade antiviral em modelos experimentais de infecção pelos betacoronavírus MHV-3 e MHV-A59. Esses modelos são considerados, respectivamente, um modelo de doença graves versus modelo de doença leve e auto-resolutiva em termos de doença pulmonar, utilizando camundongos da linhagem C57BL/6J, conforme previamente descrito (Andrade et al., 2021; J. Pimenta et al., 2023).

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos de 8 a 5 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em experimentos envolvendo MHV-3 e MHV-A59, respectivamente. Camundongos K18-Human ACE2 transgênicos originalmente obtidos do grupo “The Jackson laboratories” (<https://www.jax.org/strain/034860>), foram criados e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG para serem utilizados em testes *in vivo* com o vírus SARS-CoV-2 (Guimaraes et al., 2024).

Para infecção intranasal (i.n.) os camundongos foram anestesiados por via subcutânea com uma solução contendo 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Camundongos infectados receberam 30µL do inóculo viral contendo 1×10^3 UFP para o MHV-3; 1×10^5 UFP para o MHV-A59 e 2×10^4 para o SARS-CoV-2 como descrito por Andrade et al.,

2021. Este estudo foi previamente submetido ao comitê de ética em experimentação animal da UFMG e aprovado no protocolo 338/2023 (CEUA-UFMG).

3.6 Tratamento e análises

Para a avaliação do efeito da molécula mais promissora, DFMA, durante a infecção pelo MHV-3, os camundongos foram tratados duas vezes ao dia com 10 mg/kg de DFMA via intraperitoneal, iniciando o tratamento dois dias antes da infecção (Del Sarto et al., 2020a; Zandi et al., 2019). Importante, animais que atingiram 20% ou mais de perda do seu peso corporal inicial foram eutanasiados de acordo com as regras do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA-UFMG). Os camundongos foram randomicamente divididos nos seguintes grupos:

a) Experimento *in vivo* utilizando o MHV-3 (Fig. 6A):

- Mock veículo: Não infectados e não tratados - foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).
- Mock +DFMA: Não infectados e tratados com o DFMA, conforme previamente descrito.
- MHV-3 veículo: Infectados não tratados (em que o foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).
- MHV-3 +DFMA: Infectados e tratados com o DFMA conforme previamente descrito.

b) Experimento *in vivo* utilizando o MHV-A59 (Fig. 6B):

- Mock veículo: Não infectados e não tratados - foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).
- MHV-A59 veículo: Infectados não tratados (em que o foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).
- MHV-A59 +DFMA: Infectados e tratados com o DFMA conforme previamente descrito.

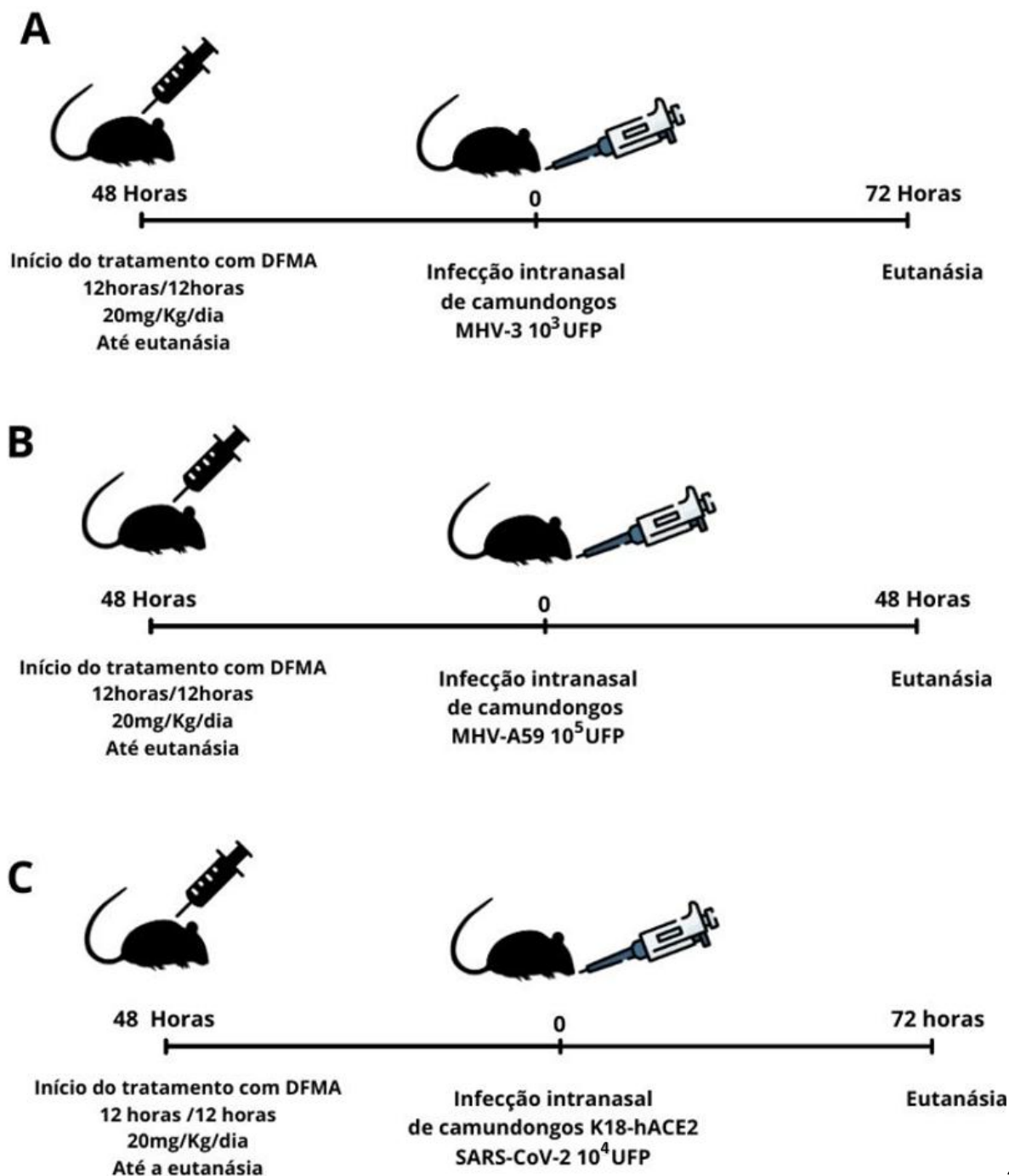
c) Experimento *in vivo* utilizando o SARS-CoV-2 (Fig. 6C):

- Mock veículo: Não infectados e não tratados - foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).

- Mock + DFMA: Não infectados e tratados com o DFMA conforme previamente descrito.
- SARS-CoV-2 veículo: Infectados não tratados (em que o foi administrado somente o veículo da droga (Salina com DMSO na concentração de 5%).
- SARS-CoV-2 + DFMA: Infectados e tratados com o DFMA conforme previamente descrito.

Figura 6. Figura 6 Protocolo experimental de infecção e tratamento com o DFMA nos diferentes modelos experimentais.

Procedimento utilizado para avaliação dos efeitos antivirais do DFMA com modelos experimentais usando camundongos selvagens contra o vírus MHV-3 (A) e MHV-A59 (B); e camundongos K18-Human ACE2 para infecção com o vírus SARS-CoV-2 (C).



a

realização da eutanásia os animais foram anestesiados com uma solução de 80 mg/kg de cetamina e 15 mg/kg de xilazina. Foi realizada laparotomia mediana seguida pela coleta do sangue pela punção da veia cava inferior. Posteriormente, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico seguido de deslocamento cervical para a coleta dos tecidos de interesse.

Foi realizada a coleta do sangue para análises de contagem total de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos e cálculo da razão granulócito/linfócito. Além disso, tecidos pulmonares foram coletados para análises de carga viral dos animais, além da quantificação da citocina pró inflamatória IL-6 e quimiocinas CXCL1 e CCL2. Cortes histológicos dos tecidos parafinizados foram feitos para análises histopatológicas dos tecidos pulmonares, além da coloração de componentes virais.

3.7 Titulação viral

A determinação da carga viral viável nos experimentos *in vitro* e nos tecidos de camundongos foi feita através de ensaio de titulação de placa. Para isso, utilizamos células L929 para o vírus MHV-3 e MHV-A59 e células Vero CCL81 para o vírus SARS-CoV-2. Em ambos os casos, as células foram plaqueadas 1×10^5 células por poço em placa de 24 poços e incubadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 horas. Após a incubação, foram feitas diluições seriadas das amostras a serem tituladas. O meio de cultura das placas foi descartado e 100 µL do homogenato de cada diluição foi inoculado em diferentes poços da placa de 24 poços. Nos poços de controle foi adicionado 100 µL de DMEM 2% SFB. Após o inóculo das diluições na placa, as mesmas foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 1 hora. Ao final da incubação, foi adicionado DMEM acrescido de CMC 1,2% e 1% de SFB previamente preparado. Seguindo, as placas foram incubadas novamente às mesmas condições mencionadas por um período de 48 horas para o vírus MHV-3/ MHV-A59 e 72 horas para o vírus SARS-CoV-2. Após o período, o formol 10% tamponado foi adicionado aos poços e aguardado um tempo de 1 hora em temperatura ambiente. O conteúdo da placa foi, então, descartado e lavado. Para corar as placas, foi utilizado cristal violeta na concentração 0,5% por 20 minutos. O corante foi removido e o as placas lavadas novamente para contagem de placas de lise, em que a conta para transformação foi de placas contadas x inverso da diluição x 10 (conversão para mL) = UFP/mL, considerando posteriormente, o peso do tecido analisado. Os resultados foram expressos em UFP/mL. No caso da titulação de tecidos, o órgão foi pesado e macerado em DMEM com 2% de SFB. O homogenato foi centrifugado a 2000g por 10 minutos. O sobrenadante foi titulado, conforme descrito e a expressão dos resultados de concentração viral foi em UFP/g de tecido.

3.8 Quantificação de RNA viral do MHV e SARS-CoV-2 por qPCR.

O RNA viral do tecido foi extraído utilizando o kit de extração de RNA viral QIAamp® Viral RNA, seguindo as orientações do fabricante com adaptações em que os tecidos foram macerados no tampão de lise do kit. As amostras foram eluídas e quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop™, Thermo Scientific). A produção do cDNA ocorreu a partir de 500ng de RNA, usando o kit iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD), seguindo as orientações do fabricante. O cDNA obtido foi diluído 10x para ser utilizado na reação de qPCR. Na reação, utilizamos o Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™) e primers específicos para detecção do MHV na concentração de 5nM: Forward 5'-CAGATCCTTGATGATGGCGTAGT-3'; Reverse 5'-AGAGTGTCCTATCCCGACTTTCTC-3'. As curvas foram obtidas através da extração de RNA de uma quantidade conhecida de UFP do vírus MHV-3 e os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias/50ng de cDNA. A quantificação de RNA viral de SARS-CoV-2 foi realizada através do kit 2019-nCoV RUO kit (IDT) para região N1 e a reação foi feita na CFX Opus 96 (BIO-RAD). Curvas foram produzidas a partir de um conhecido número de cópias de RNA viral utilizando o 2019-ConV N Positive Control (IDT). Os resultados foram expressos em número de cópias por dosagem específicas de cDNA.

3.9 Análises hematológicas

Foi realizada a coleta do sangue após a eutanásia e avaliação dos parâmetros no analisador hematológico veterinário (MEK 6550J/K – Celltak). Após a leitura dos resultados, o sangue foi centrifugado a 4°C a 5000RPM por 10 minutos, e o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior dosagem análise de titulação viral presente no plasma.

3.10 Avaliação histológica

Os pulmões esquerdos e um lobo do fígado dos camundongos foram recolhidos e fixados em solução de formol 10% tamponado após a eutanásia. As amostras foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo e fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas para determinação do padrão inflamatório, conforme descrito por Andrade e colaboradores

(2021). O grau de inflamação foi quantificado usando um escore semi-quantitativo da gravidade das alterações observadas. Os pontos foram distribuídos da seguinte forma: 0-5 para inflamação do parênquima e 0-5 para o infiltrado de polimorfonuclear (0-ausente, 1-mínimo, 2-pouco, 3- moderado, 4-intenso e 5-muito intenso); 0-4 inflamação das vias aéreas e 0-4 inflamação vascular (0-ausência de células inflamatórias, 1- presença de poucas células inflamatórias, 2- presença de inflamação significativa e focalizada, 3- presença de inflamação disseminada, 4- inflamação significativa e disseminada). O total do escore histopatológico representa 18 pontos. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturados e fotografados no Microscópio Olympus Bx41 nas objetivas de 5X e 20X.

3.11 imuno-histoquímica.

Cortes histológicos de pulmão de animais infectados tratados ou não tratados com o DFMA foram processados com a finalidade da realização de coloração da proteína N do MHV e proteína S do SARS-CoV-2 através da técnica de imuno-histoquímica. O processo foi feito utilizando um protocolo de estreptavidina+biotina. A peroxidase endógena foi bloqueada utilizando o peróxido de hidrogênio 0,3% e a recuperação antigênica foi feita com solução tampão EDTA 1,266mM pH=8. Os cortes foram incubados juntamente com os anticorpos primários Anti-MHV nucleocapsideo NR-45106 - Lote 7003428 fornecidos pela BEI resources e utilizados na diluição 1:100. Para marcação do SARS-CoV-2, utilizamos o anticorpo SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody (Sino biological - 40591-T62) na diluição 1:500. Posteriormente, o corte foi incubado com o kit secundário Mouse on Mouse adquiridos da Vector Labs (EUA) para marcação do MHV e ABC kit (Vector laboratories) anti-rabbit para marcação do SARS-CoV-2, posteriormente revelado com o cromógeno DAB e contracorada com hematoxilina. Os controles de reação negativa foram feitos em cortes no quais os anticorpos primários não foram adicionados.

3.12 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) ou apenas como média. As médias foram comparadas utilizando-se análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de Turkey. Os resultados foram considerados significativos quando valor

de $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 9. A exclusão de valores outliers foi feita através da própria plataforma do software Graphpad PRISM7.

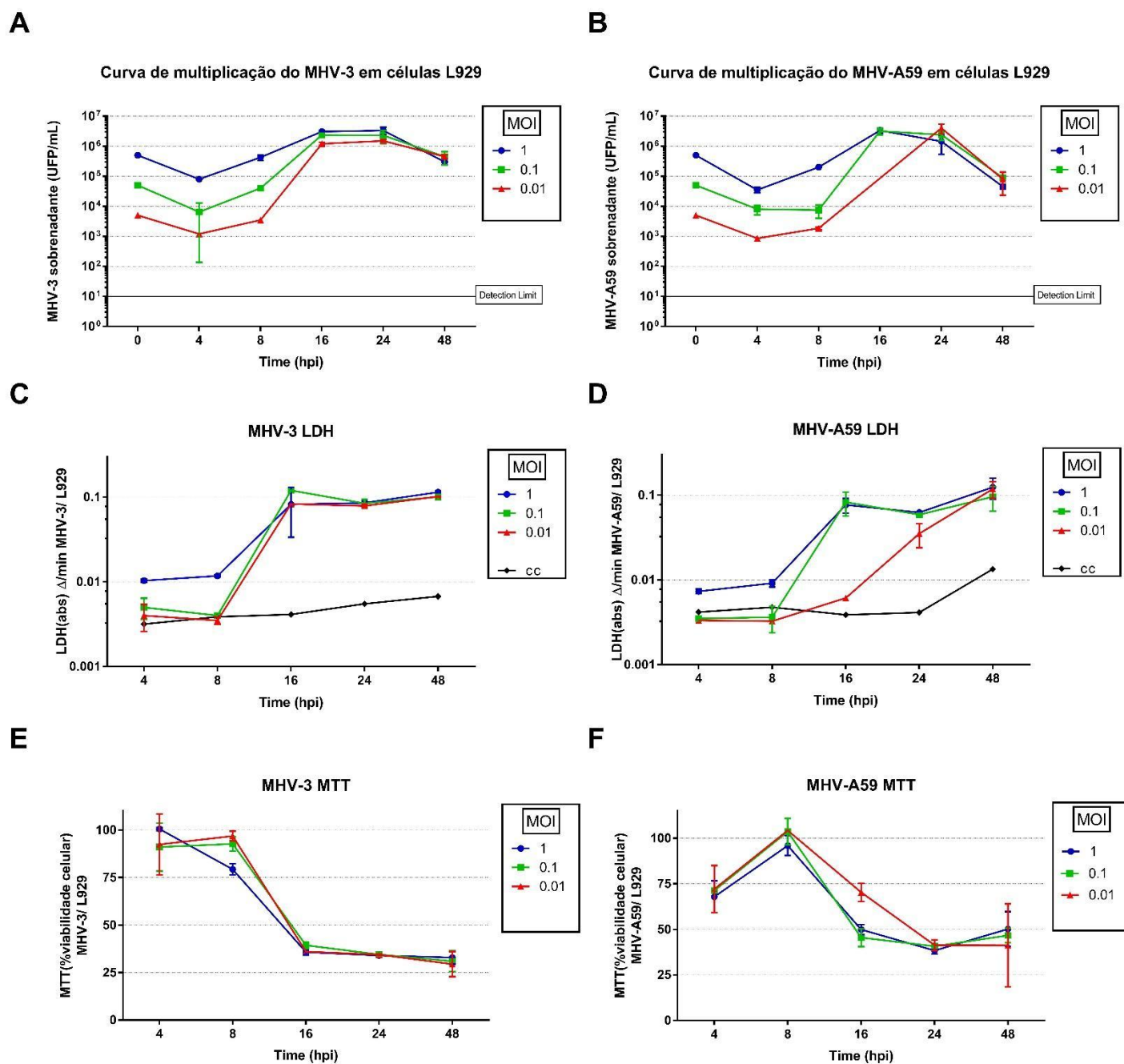
4. Resultados

4.1 Padronização da infecção pelo MHV-3 e MHV-A59 em células L929

Com a finalidade de avaliar a ação de potenciais candidatos antivirais (reposicionamento de drogas) frente à infecção por coronavírus, inicialmente foi realizada uma cinética para padronização da infecção pelos coronavírus murinos MHV-3 e MHV-A59 em linhagem de fibroblastos murinos (L929). Para isto, foram avaliados os tempos de 4, 8, 16, 24 e 48 horas pós-inoculação viral, além de diferentes Multiplicidades de Infecção (MOI) (1; 0,1; 0,01). Após a infecção nos tempos e condições determinados, foi feita a análise do título viral presente no sobrenadante (Fig. 7A, B), além do teste de morte celular por LDH (lactato desidrogenase) (Fig. 7C, D) e viabilidade celular por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Fig. 7E, F). Foi, portanto, definido que a avaliação dos compostos com potencial atividade antiviral seria realizada no período de 16 horas pós-inoculação com a MOI de=0,01, visto que neste tempo foi recuperado o maior título viral (1000 vezes maior que o inoculado), ainda com células viáveis para ambas as linhagens de vírus MHV-3 e MHV-A59.

Figura 7. Cinética da infecção por MHV-3 e MHVA-59 em células L929.

Células L929 foram infectadas na MOI 1; 0,1; 0,01 em placa de 96 poços e a curva de multiplicação dos vírus MHV-3 (A) e MHV-A59 (B) avaliada por A-B titulação viral em células L929. Os resultados são expressos em UFP/mL de sobrenadante. Além disso, foi feito ensaio de LDH (C-D) a partir do sobrenadante de células em diferentes tempos após a inoculação dos vírus MHV-3 (C) e MHV-A59 (D). Os resultados são expressos em Δ absorvância / min. O ensaio de MTT foi feito ainda em diferentes tempos e MOI utilizando os vírus MHV-3 (E) e MHV-A59 (F). Os resultados são expressos em porcentagem de viabilidade celular. O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB. n=3



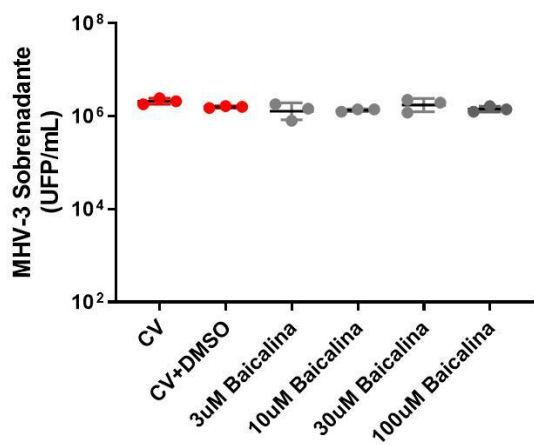
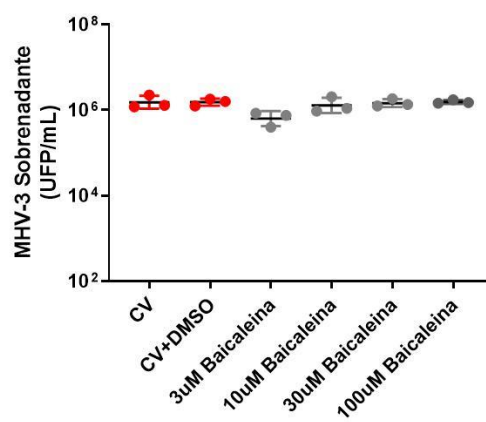
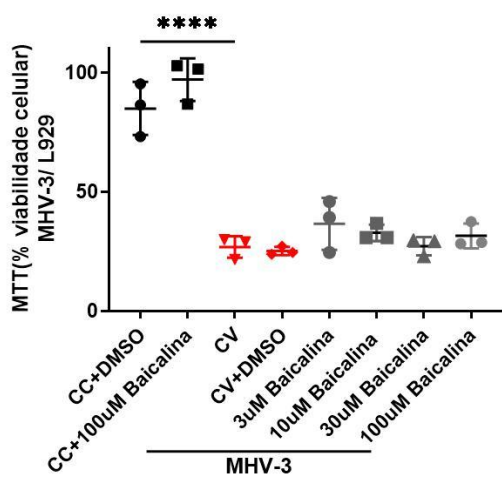
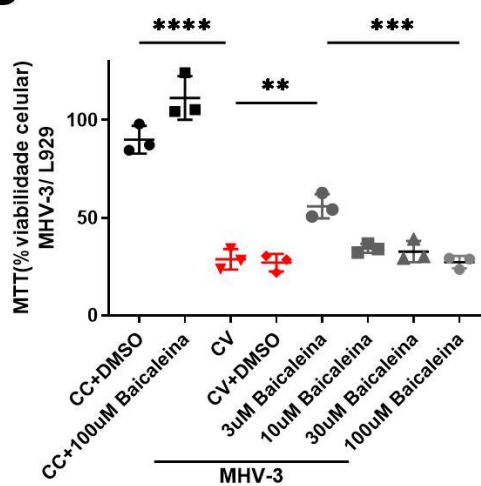
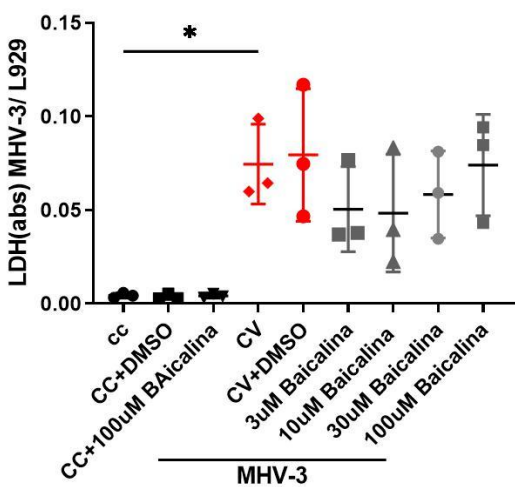
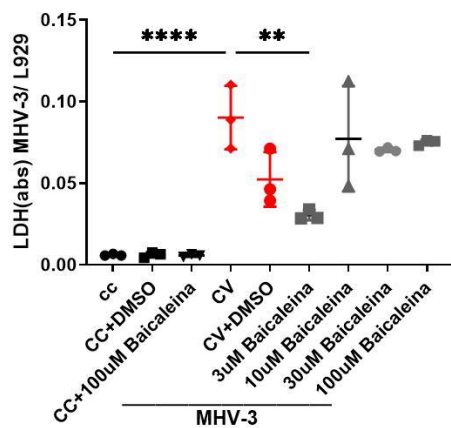
4.2 Avaliação do potencial antiviral da Baicalina e Baicaleína contra o MHV-3

Iniciando os testes com os potenciais antivirais, primeiramente foi testada a capacidade de redução dos títulos virais e capacidade de recuperação da viabilidade

celular da Baicalina e Baicaleína. Foi então realizada uma dose-resposta com concentrações variando, primeiramente, de 3 μM a 100 μM tanto da Baicalina quanto da Baicaleína. Os resultados demonstram que o tratamento das culturas celulares infectadas com o MHV-3 tratadas com ambas as moléculas não apresentaram efeitos antivirais conforme avaliados na titulação do sobrenadante realizada 16 horas após a infecção (Fig. 8 A, B). Além disso, foi possível avaliar que as concentrações testadas não apresentaram toxicidade nos parâmetros de MTT (Fig. 8 C, D) e LDH (Fig. 8 E, F). Foi possível avaliar uma maior viabilidade celular em células infectadas com o MHV-3 quando tratadas com 3 μM de baicaleína tanto no parâmetro de MTT (Fig. 8D), quanto de LDH (Fig. 8F). Devido aos resultados pouco expressivos que não indicavam um efeito dos flavonóides na infecção pelo MHV, decidimos por não dar seguimento aos testes com a Baicalina e Baicaleína.

Figura 8. Avaliação do potencial antiviral da Baicalina ou Baicaleína in vitro contra o vírus MHV-3 em células L929.

As células foram infectadas na MOI 0.01 e coletados os sobrenadantes após 16 horas, em que foram avaliados os efeitos da Baicalina e Baicaleína na titulação viral (**A, B**), MTT na monocamada de células, tendo o resultado expresso em porcentagem de viabilidade celular (**C, D**), e LDH também no sobrenadante (**E, F**), em que os resultados foram expressos em Δ absorvância / min. Os testes foram feitos em concentrações de 3 μM , 10 μM , 30 μM e 100 μM . O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB. O controle viral (CV) recebeu somente o inóculo na MOI 0.01, acrescido a 1% de SFB. No grupo CV+DMSO, o inóculo viral foi introduzido juntamente à maior concentração de DMSO utilizada para diluir a baicalina e baicaleína. Foi feito one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.* $p < 0.05$ n=3.

A**B****C****D****E****F**

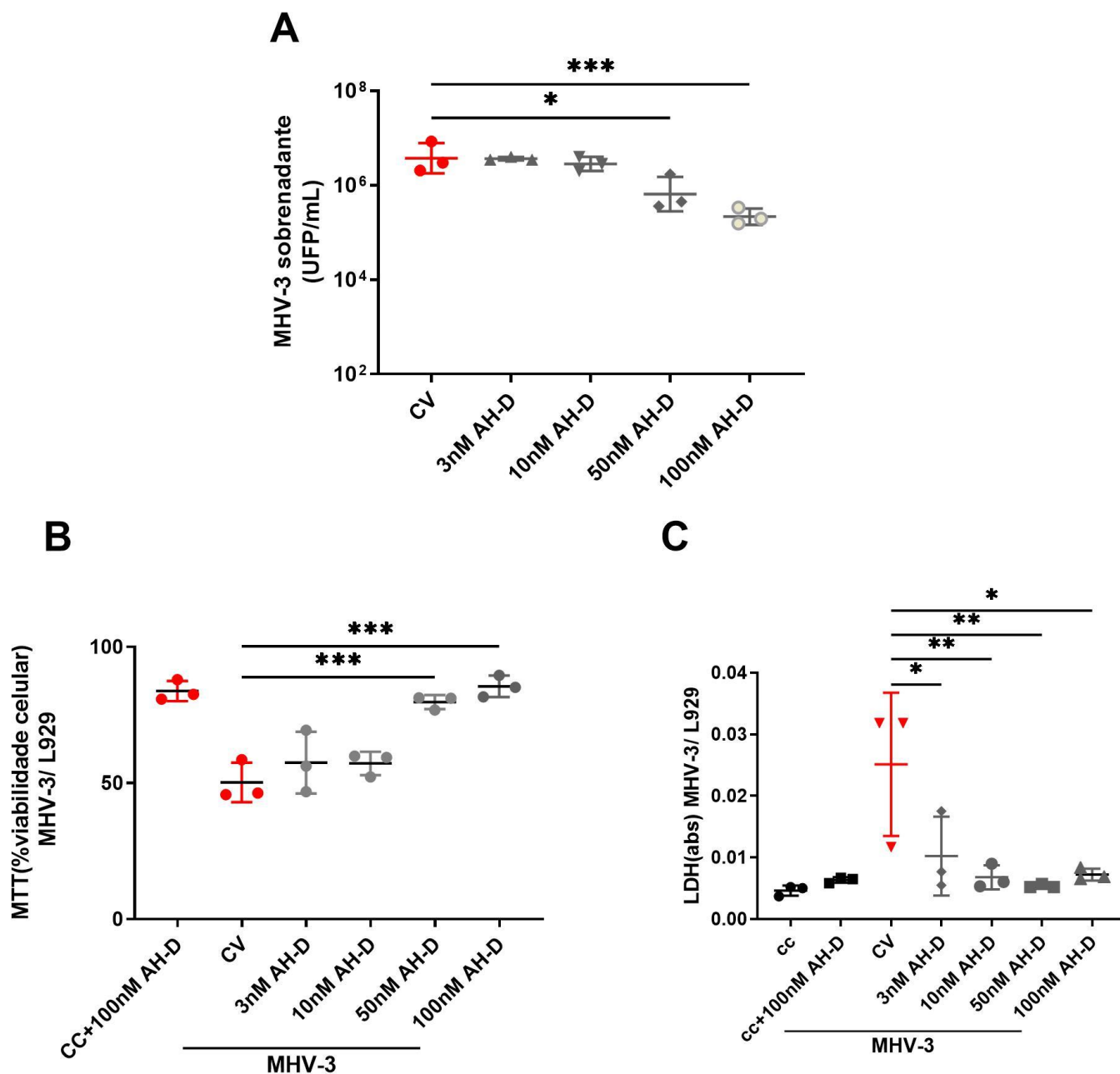
4.3 Avaliação do potencial antiviral do peptídeo AH-D contra o MHV-3 e SARS-CoV-2 *in vitro*.

Em seguida, o próximo potencial antiviral a ser testado foi o peptídeo AH-D. O inóculo viral foi previamente incubado por uma hora junto a diferentes concentrações do peptídeo variando de 3nM a 100nM, e posteriormente adicionado à monocamada de células L929 previamente semeadas. 16 horas após a infecção, a carga viral no sobrenadante foi analisada, e constatou-se que, na concentração de 100nM, o tratamento com o AH-D foi capaz de reduzir o título viral em cerca de 10X quando comparado às células infectadas não tratadas (CV) (Fig. 9A). Além disso, a incubação com o AH-D esteve ainda associado a uma melhora parcial da viabilidade celular demonstrada pela análise do MTT em concentrações a partir de 50nM (Fig. 9B). Ainda, houve melhora nos parâmetros de LDH em concentrações a partir de somente 3nM (Fig. 9C).

Figura 9. Avaliação do potencial antiviral do peptídeo AH-D contra o vírus MHV-3 em células L929.

O vírus foi inoculado na MOI 0.01 após a incubação com diferentes concentrações de 3 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M do peptídeo AH-D em *placas* de 96 poços previamente *plaqueadas* com células L929. O sobrenadante foi coletado após 16 horas. Foram avaliados os efeitos do peptídeo AH-D no título viral (**A**); MTT da monocamada de células (**B**), tendo o resultado expresso em porcentagem de viabilidade celular; e LDH (**C**), que os resultados foram expressos em Δ absorbância / min. O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB. O controle viral (CV) recebeu somente o inóculo na MOI

0.01, acrescido a 1% de SFB. Foi feito one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0.05$ comparado ao grupo CV $n = 3$.

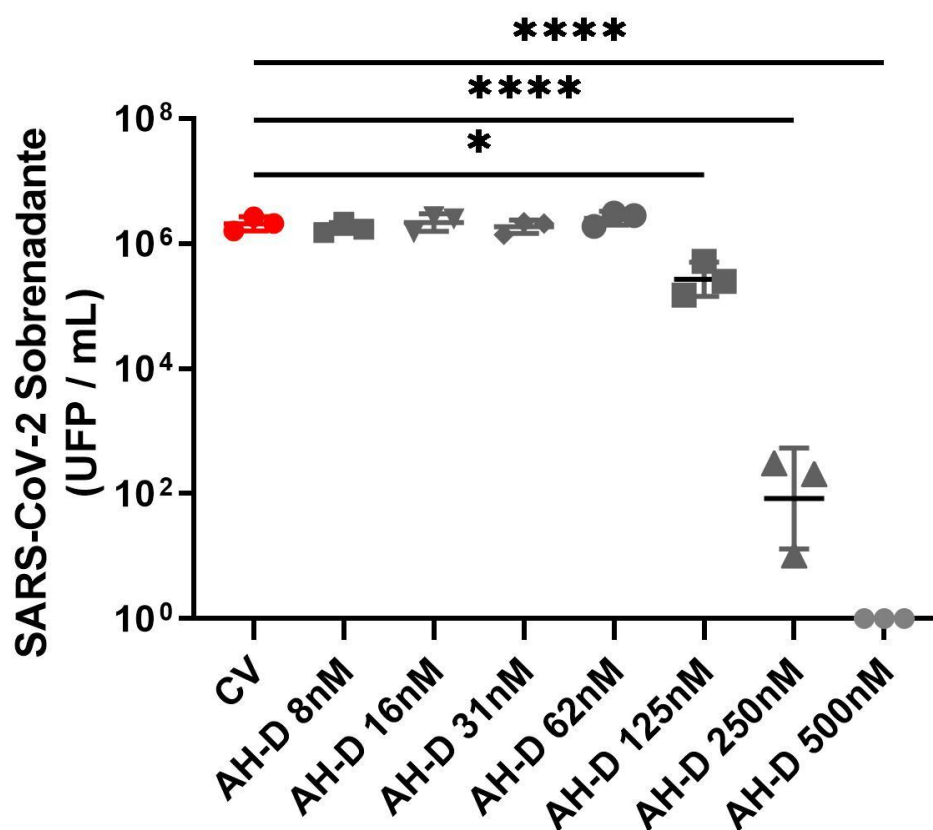


Diante da atividade virucida observada contra o MHV-3, um novo experimento foi realizado para avaliar o efeito do AH-D contra o SARS-CoV-2. O inóculo viral foi incubado por 90 minutos com diferentes concentrações do peptídeo AH-D, seguindo o mesmo protocolo experimental anterior. Após a incubação, o inóculo foi aplicado à monocamada de células Vero, visando avaliar a eficácia do peptídeo nas condições testadas. Os títulos virais do sobrenadante de células infectadas com o SARS-CoV-2 não expostos ao AH-D ultrapassaram 10^6 UFP/mL, demonstrando uma diminuição

significativa quando o inóculo foi previamente incubado juntamente com o peptídeo a partir de 125nM, tendo efeitos ainda maiores nas concentrações de 250nM e 500nM (Fig. 10). Os resultados com o AH-D se mostraram muito promissores e, devido à falta de disponibilidade imediata do peptídeo para realização de experimentos *in vivo*, os testes em camundongos estão sendo realizados neste momento.

Figura 10. Teste de potencial ação virucida do peptídeo AH-D quando incubado com o inóculo viral previamente à infecção.

Os testes foram feitos em que o inóculo viral foi previamente incubado a diferentes concentrações de 8nM, 16nM, 31nM, 62nM, 125nM, 250nM e 500nM. Após a incubação, o inóculo viral foi aplicado à monocamada de células Vero e, após 24 horas, o sobrenadante foi titulado para quantificação do vírus SARS-CoV-2. No grupo DMSO, o inóculo viral foi incubado juntamente à maior concentração de DMSO utilizada para diluir o peptídeo AH-D. * $p < 0.05$ comparado ao grupo DMSO. Foi feito one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey **** $p < 0,0001$ comparado ao grupo DMSO $n=2$.



4.4 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-3/MHV-A59 *in vitro*

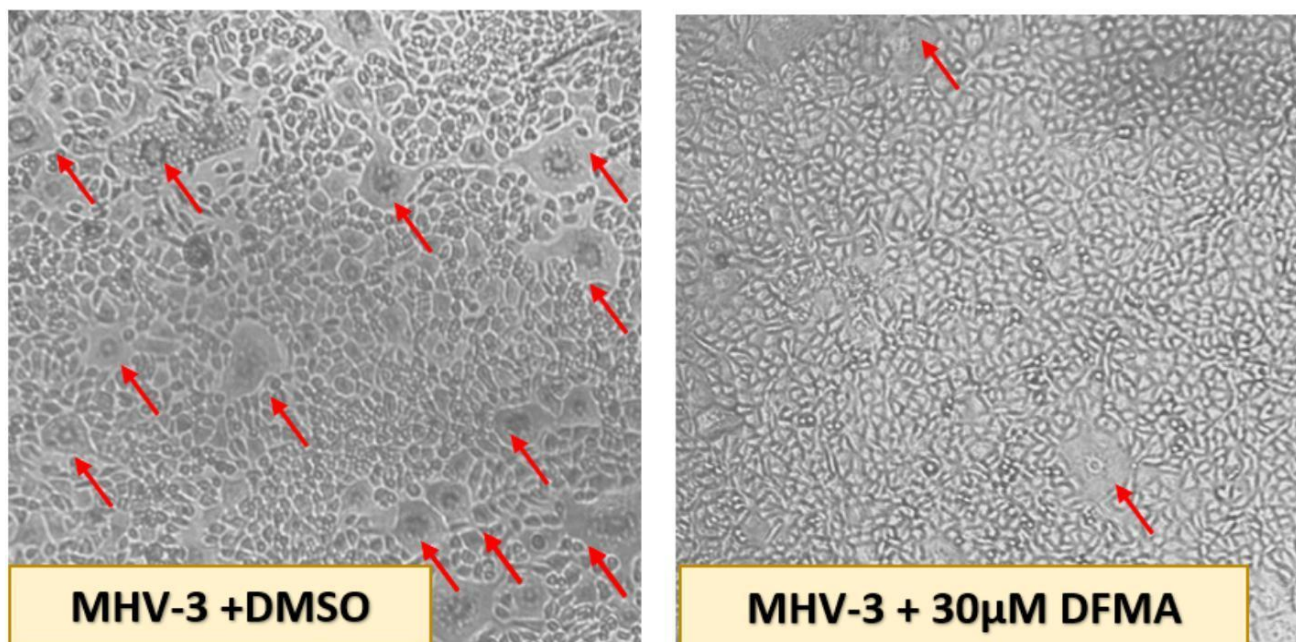
Seguindo a ordem de potenciais antivirais a serem testados, o DFMA, um análogo de nucleosídeo, teve sua capacidade antiviral avaliada contra o vírus MHV-3. O MHV-3 induziu a formação de numerosos sincícios em células L929 com um MOI = 0,01 (Fig.

11A). O DFMA a 30 μM foi capaz de restaurar parcialmente a morfologia original das células L929, como mostrado nas imagens representativas (Fig. 11A). O DFMA exibiu uma expressiva atividade antiviral, reduzindo os títulos no sobrenadante das células infectadas, com efeitos observáveis a partir de 10 μM (Fig. 11B). Além disso, foi avaliada uma redução de 1.000 vezes nos títulos virais em concentrações de 30 μM de DFMA (Fig. 11B). A morte celular da monocamada de L929 foi quantificada utilizando o ensaio de LDH e o ensaio demonstrou que o MHV-3 induziu um aumento significativo na morte celular. Na presença de DFMA a partir de 10 μM , observou-se uma redução parcial da morte celular, sendo ainda mais acentuada a 30 μM , em que o DFMA foi capaz de restaurar completamente os níveis de LDH, retornando aos níveis basais observados em células não infectadas. (Fig. 11C).

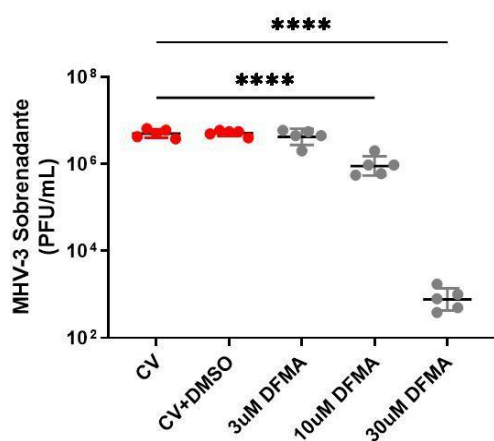
Figura 11. Avaliação do análogo de nucleosídeo DFMA como potencial antiviral contra o vírus MHV-3 em células L929.

As células foram infectadas na MOI 0.01 e diferentes concentrações de DFMA adicionadas juntamente com o momento da infecção. Foram coletados os sobrenadantes após 16 horas e a monocamada foi fotografada e apresentada de forma representativa (A), em que as setas indicam a formação de sincícios. Além disso, foi avaliado os títulos virais presentes no sobrenadante (B); e LDH (C), tendo os resultados expressos em Δ absorvância / min. Os testes foram feitos em concentrações de 3 μM , 10 μM e 30 μM . O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB. No grupo CV+DMSO o inóculo viral foi introduzido juntamente a uma concentração de DMSO referente a maior concentração de DFMA utilizada para diluir o análogo de nucleosídeo. Foi feito one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. ****p<0.0001; ***p<0.0003. n=3

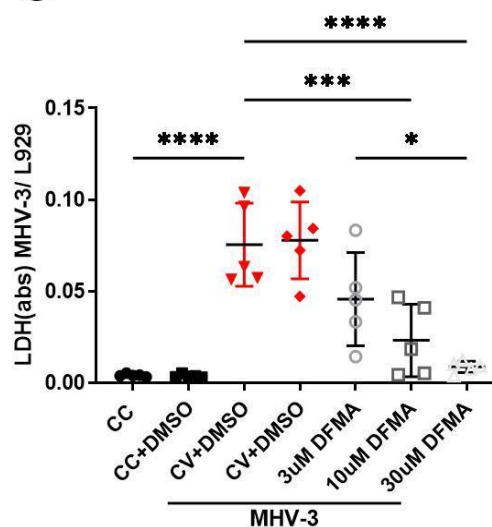
A



B



C



Um segundo ensaio foi realizado para avaliação dos efeitos do DFMA dentro de um contexto de infecção pelo vírus MHV-A59. Foi possível observar que, em células não tratadas com o DFMA, o vírus MHV-A59 induziu a formação de diversos sincícios em células L929 na MOI de 0.01 (Fig. 12A). De maneira interessante, o DFMA na concentração de 30 μ M já foi capaz de prevenir a formação dos sincícios nas células L929, como demonstrado nas imagens representativas (Fig. 12A). Além disso, a

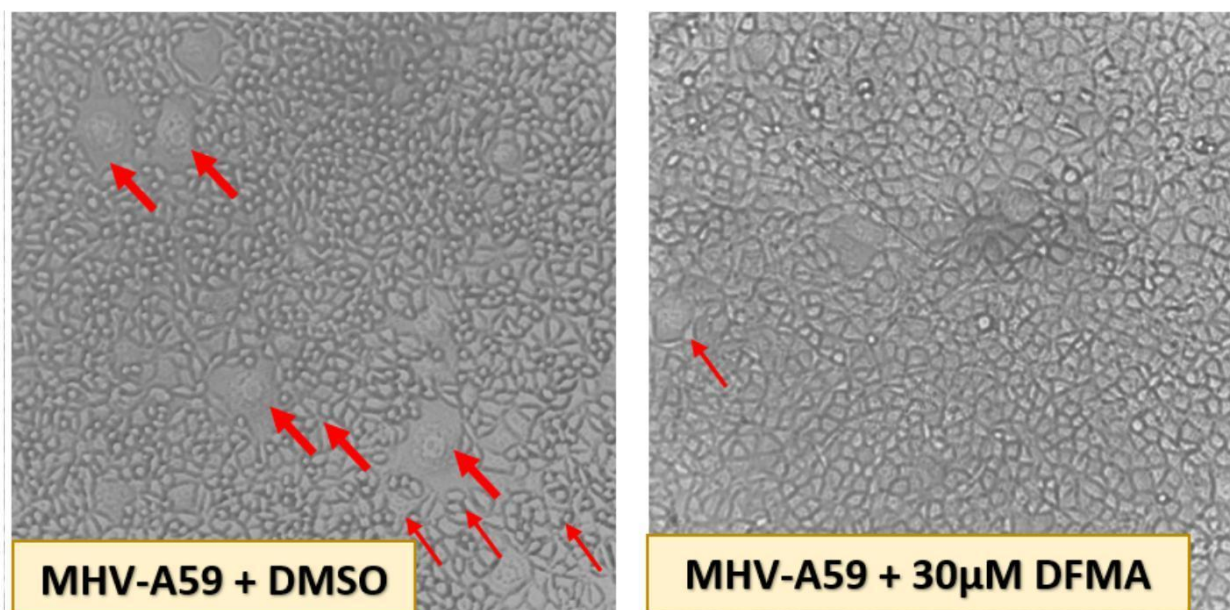
quantificação de vírus do sobrenadante de células infectadas com o MHV-A59 demonstrou que o DFMA foi capaz de reduzir significativamente os títulos virais recuperados, já na concentração de 10 μM . Em concentrações mais altas de 30 μM , o DFMA teve resultados ainda mais promissores, alcançando uma redução de mais de 10X o título viral recuperado do sobrenadante (Fig. 12B).

As análises de morte celular demonstraram que a infecção pelo MHV-A59 foi capaz de elevar os níveis de LDH presente no sobrenadante das células. Contudo, o DFMA foi capaz de, significativamente, reduzir os níveis de LDH em concentrações a partir de 10 μM , tendo seu efeito ainda mais acentuado em concentrações mais altas de 30 μM (Fig. 12C).

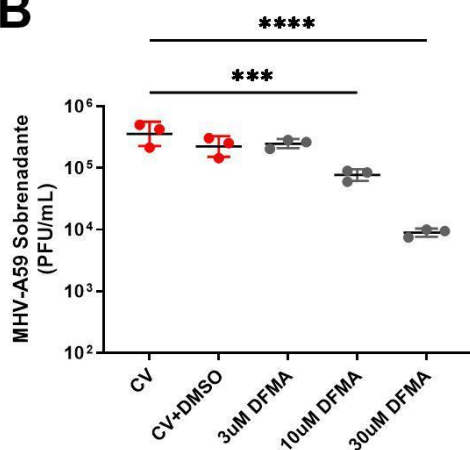
Figura 12. Avaliação da atividade antiviral do composto DFMA contra o vírus MHV-A-59 em células L929.

As células L929 plaqueadas previamente em placa de 96 poços foram infectadas na MOI 0.01 e tratadas imediatamente com o DFMA em concentrações de 3 μM , 10 μM e 30 μM . Ao final de 16 horas após a infecção, as células foram fotografadas, conforme demonstrado de forma representativa, que as setas indicam a formação de sincícios (**A**). Neste mesmo tempo, foi ainda avaliado os títulos virais no sobrenadante de cada poço (**B**), além de e LDH (**C**), tendo os resultados expressos em Δ absorbância / min. Os testes foram feitos em concentrações de 3 μM , 10 μM e 30 μM . O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB. No grupo CV+DMSO o inóculo viral foi introduzido juntamente a uma concentração de DMSO referente a maior concentração de DFMA utilizada para diluir o análogo de nucleosídeo. Foi feito one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. ****p<0.0001; ***p<0.0003. n=3

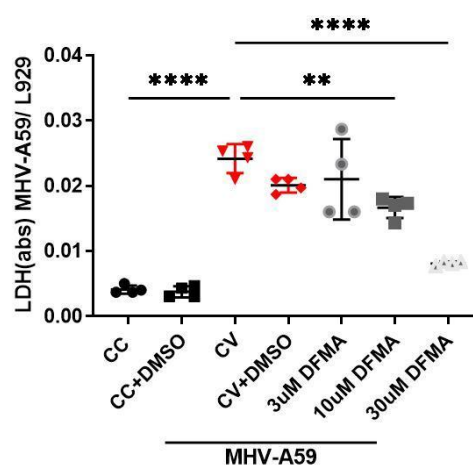
A



B



C



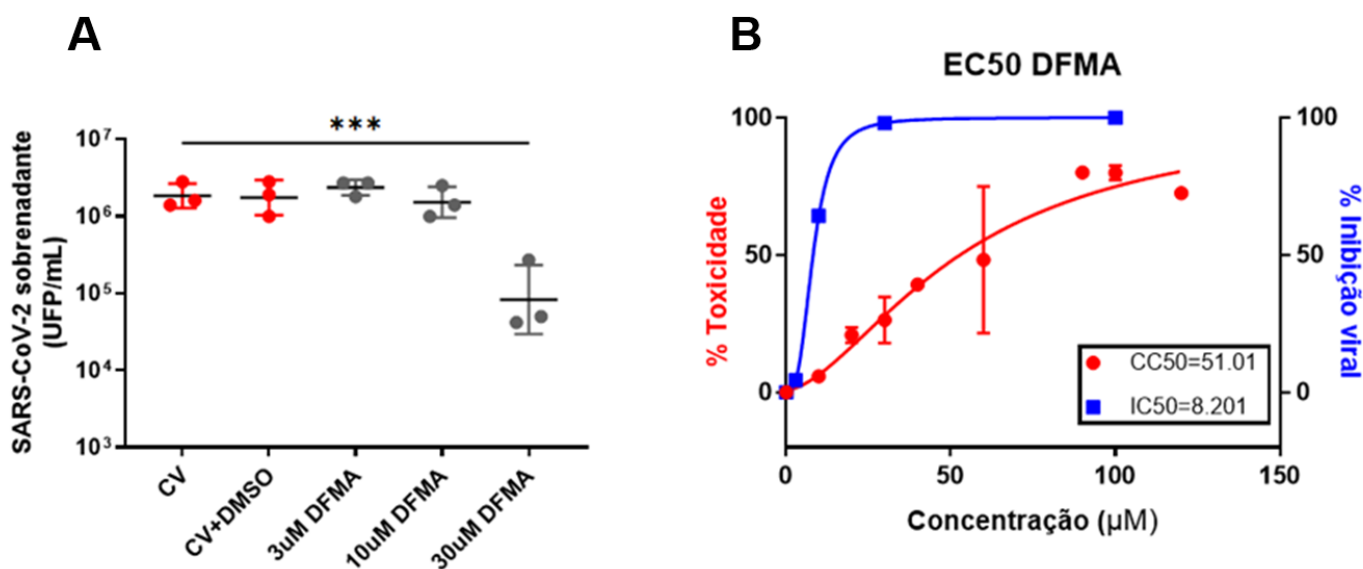
4.5 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o SARS-CoV-2 *in vitro*.

Com a finalidade de avaliar o potencial efeito antiviral do DFMA frente à infecção pelo o vírus SARS-CoV-2, células de epitélio pulmonar imortalizadas (Calu-3) foram infectadas na MOI 0.01 e tratadas com concentrações de DFMA de 3 µM, 10 µM e 30 µM. Após 24 horas, foi feita uma re-adição de DFMA com as mesmas concentrações definidas. A presença do DFMA no meio DMEM, em concentrações de 30 µM, já foi capaz de induzir uma redução de aproximadamente 15 vezes no título viral

recuperado em comparação ao sobrenadante de células na ausência do análogo de nucleosídeo (Fig. 13A), com um valor de IC₅₀ de 8,201 (Fig. 13B). Para avaliar a citotoxicidade do DFMA em células Calu-3, a monocamada celular foi exposta a diferentes concentrações de DFMA, resultando em um CC₅₀ de 51,01 (Fig. 13B) e um IS (Índice de Seletividade) de 6,22, sendo considerado um antiviral potente e promissor.

Figura 13. Citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral do DFMA in vitro contra o SARS-CoV-2.

As células Calu-3 foram infectadas por SARS-CoV-2 na MOI = 0,01, com o DFMA adicionado simultaneamente em concentrações variando de 3 µM a 30 µM. O CV (Controle Viral) recebeu apenas o inóculo viral, e o CV+DMSO recebeu o inóculo viral acrescido de 1% de DMSO. Após 24 horas, um segundo inóculo de DFMA foi adicionado ao sobrenadante nos poços correspondentes. Foi feita a titulação do sobrenadante (A). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey foi realizado, ***P < 0,001. Além disso, um ensaio de citotoxicidade foi conduzido por MTT para determinar o CC₅₀ de 51,01 para o DFMA e o IC₅₀ de 8,201, avaliado por regressão não linear. Isso permitiu o cálculo do Índice de Seletividade IS = 6,22 do DFMA dentro deste contexto (B).



4.6 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-3 *in vivo*.

Dada a capacidade promissora do DFMA a partir dos resultados obtidos, e seguindo nosso plano de trabalho, seria de grande importância a evolução para testes *in vivo*. Sabendo da capacidade do MHV-3 de induzir uma doença grave, sistêmica e letal, sendo considerado um bom modelo capaz de mimetizar a COVID aguda grave em camundongos (Andrade et al., 2021; Campolina-Silva et al., 2023; Oliveira et al., 2024; J. Pimenta et al., 2023), animais foram infectados com 10³ UFP de MHV-3 por via intranasal. O modelo de infecção foi previamente padronizado e descrito por Andrade

e colaboradores (2021). Neste experimento, foram avaliados os efeitos do tratamento intraperitoneal com o análogo de nucleosídeo DFMA (10mg/Kg duas vezes ao dia, a partir de dois dias antes da infecção) no contexto de infecção pelo vírus MHV-3.

Primeiramente, a carga viral nos pulmões dos camundongos foi quantificada por qPCR, mostrando que os camundongos infectados com MHV-3 apresentavam RNA viral nos pulmões no terceiro dia após a infecção. O tratamento com o DFMA levou a uma redução significativa de aproximadamente 90% da quantificação de cópias de RNA viral nos pulmões de camundongos tratados (Fig. 14A). Os dados de quantificação viral no pulmão dos animais foram ainda apresentados de forma representativa por imuno-histoquímica com a coloração da proteína N do MHV-3 (Fig. 14B). As análises histológicas mostraram um score inflamatório mais elevado nos pulmões de camundongos infectados com MHV-3, caracterizado principalmente por um infiltrado celular de células polimorfonucleares (Fig. 14C, D). O aumento observado do escore inflamatório induzido pela infecção por MHV-3 não foi totalmente reduzido com o tratamento de DFMA (Fig. 14D).

Sabendo da importância que a tempestade de citocinas possui no contexto da COVID-19, foi realizada a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no tecido pulmonar, e as análises demonstraram que a infecção por MHV-3 induziu um aumento na quantificação das quimiocinas CXCL1 (Fig. 14E) e CCL2 (Fig. 14F), assim como um aumento nos níveis da citocina IL-6 (Fig. 14G). O tratamento com DFMA não apenas foi capaz de reduzir a carga viral, mas essa redução também levou à reversão dos níveis elevados dos mediadores CXCL1 (Fig. 14E) e IL-6 (Fig. 14G), quando comparado ao grupo não tratado.

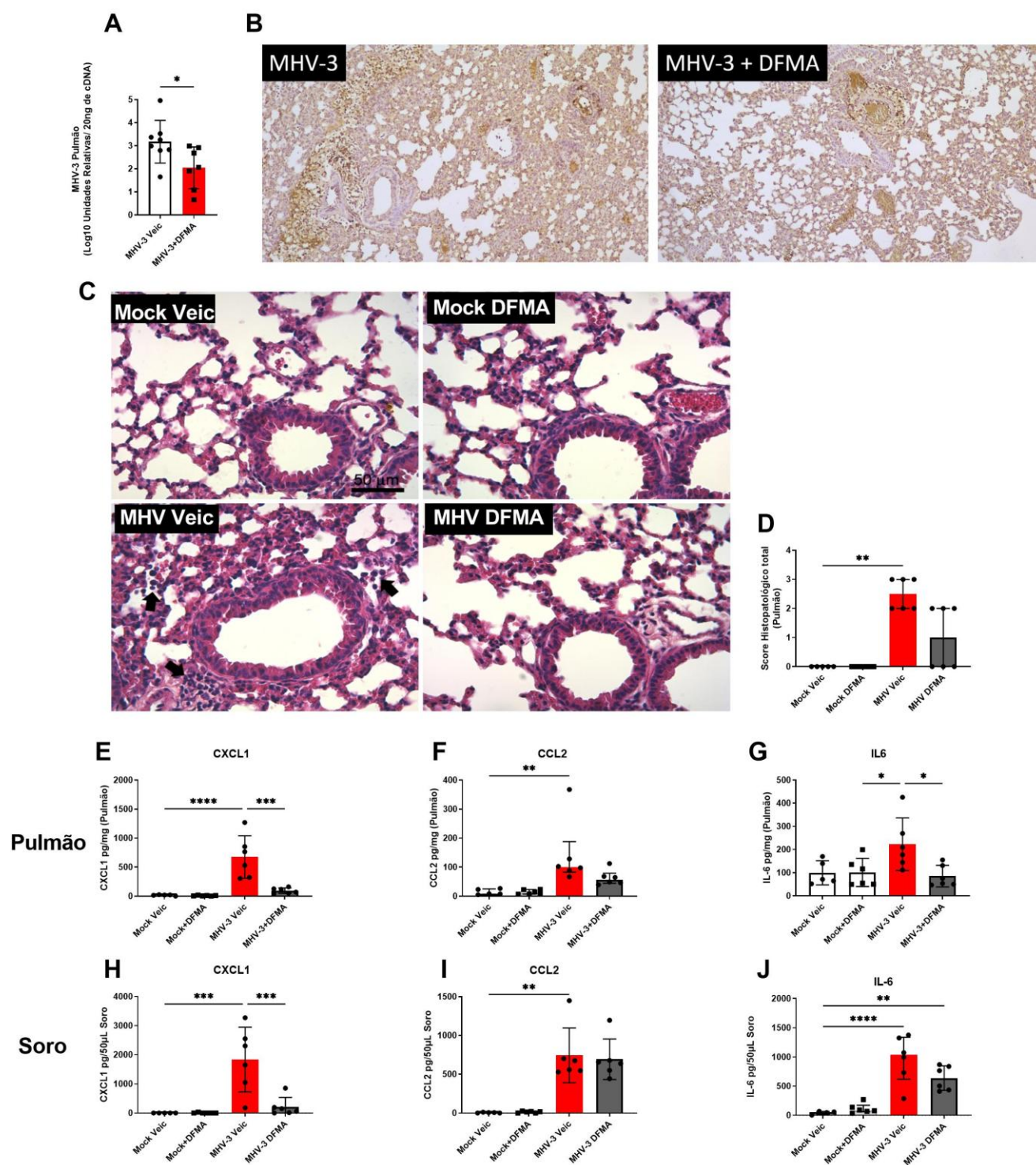
Além do contexto pulmonar, a infecção pelo MHV-3 também foi capaz de aumentar sistemicamente os níveis dos mediadores CXCL1 (Fig. 14H), CCL2 (Fig. 14I) e IL-6 (Fig. 14J) no soro dos animais infectados. De maneira interessante, o tratamento com DFMA foi capaz de reverter esse aumento e restaurar os níveis basais da quimiocina CXCL1 (Fig. 14H), embora não tenha mostrado diferença significativa para os mediadores CCL2 (Fig. 14I) e IL-6 (Fig. 14J).

Em um segundo experimento, um grupo de camundongos permaneceu monitorado até o quinto após a infecção para avaliação clínica. Os resultados mostraram um

aumento significativo no escore clínico dos camundongos infectados com MHV-3, embora o tratamento com DFMA não tenha sido capaz de melhorar as condições clínicas desses camundongos $p=0,0623$ (Dados não apresentados).

Figura 14. Efeitos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-3 *in vivo*.

Os camundongos foram tratados a cada 12 horas, iniciando dois dias antes da infecção, tratando duas vezes ao dia na dose 10 mg/kg, até o segundo dia pós-infecção. Os camundongos foram infectados com MHV-3 e eutanasiados no terceiro dia pós-infecção. A carga viral no tecido pulmonar foi quantificada por RT-qPCR e expressa como Unidades Relativas/20 ng de cDNA **(A)**. Imagens representativas dos pulmões de camundongos infectados por MHV-3, com ou sem tratamento com DFMA, foram demonstradas com marcação específica para o vírus MHV-3 **(B)**. Outra imagem representativa é apresentada, demonstrando que em camundongos infectados não tratados, observa-se aumento do infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar. As setas indicam a presença de leucócitos nas regiões alveolar e perivascular **(C)**. O escore inflamatório dos tecidos pulmonares dos diferentes grupos foram quantificados **(D)**. A dosagem de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar estão representadas para CXCL1 **(E)**, CCL2 **(F)** e IL-6 **(G)**. Os mesmos mediadores também foram quantificados no soro: CXCL1 **(H)**, CCL2 **(I)** e IL-6 **(J)**. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para os gráficos **(E)**, **(G)**, **(H)** e **(I)**; Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para os gráficos **(D)**, **(F)** e **(I)**; Teste T foi utilizado para comparações entre dois grupos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $n = 6-8$.



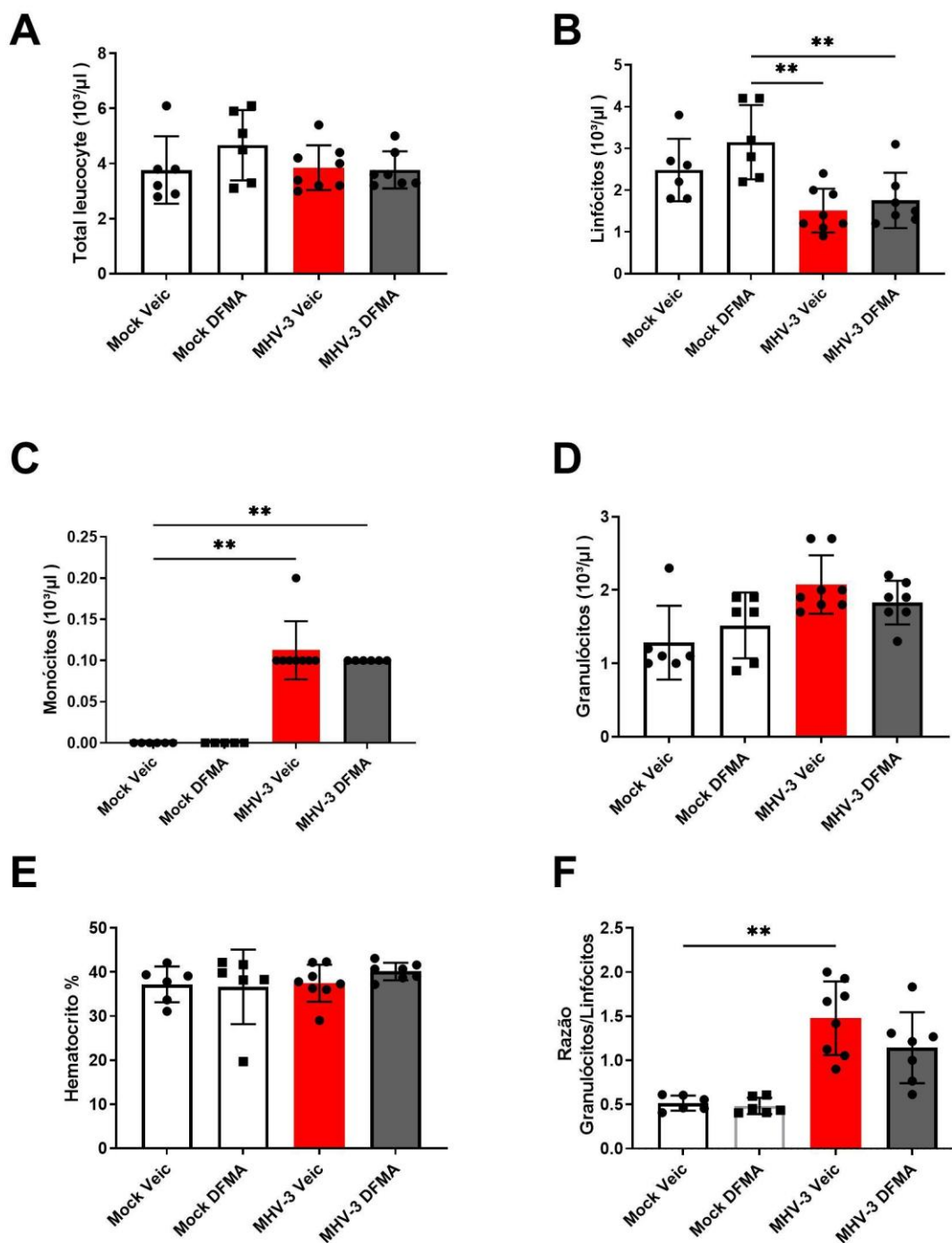
Analisamos ainda dados do sangue dos animais para acessar possíveis efeitos sistêmicos da infecção e do efeito do tratamento nestes parâmetros. Não houve diferenças significativas na contagem de leucócitos totais entre os grupos analisados

(Fig. 15A). A infecção pelo vírus MHV-3 esteve associada a uma diminuição na contagem de linfócitos (Fig. 15B), acompanhado de um aumento da contagem de monócitos no sangue de camundongos infectados pelo MHV-3 (Fig. 15C), contudo, o tratamento com o DFMA não foi capaz de reverter tais parâmetros. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quando comparados a contagem de granulócitos (Fig. 15D) e o hematócrito (Fig. 15E).

A razão granulócito/linfócito foi avaliada, e em nosso modelo, camundongos infectados pelo MHV-3 apresentaram níveis aumentados da razão granulócito/linfócito, contudo, o tratamento com o DFMA não foi capaz de reverter tais parâmetros ($p=0,1966$) (Fig. 15F).

Figura 15. Efeitos sistêmicos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-3 *in vivo*.

Os camundongos foram tratados a cada 12 horas, iniciando dois dias antes da infecção, tratando duas vezes ao dia na dose 10 mg/kg, até o segundo dia pós-infecção. Os camundongos foram infectados com MHV-3 e eutanasiados no terceiro dia pós-infecção. Foi feita análises do sangue dos animais para leucócitos totais (A), quantificação de linfócitos (B), monócitos (C), granulócitos (D), hematócrito (E) a razão entre granulócitos e linfócitos (F). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para o gráfico (B); Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para os gráficos (A), (C), (D), (E) e (F) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $n = 6-8$.



Diante dos resultados promissores obtidos com o tratamento antiviral no modelo de infecção por MHV-3, avaliamos se o DFMA teria um impacto semelhante *in vivo* para outros coronavírus.

4.7 Avaliação do potencial antiviral do DFMA contra o MHV-A59

Sabendo que as complicações da COVID-19 não se manifestam apenas de forma grave, a capacidade antiviral do DFMA também foi analisada em um modelo de COVID leve-moderada e auto-resolutiva, do ponto de vista pulmonar, em animais C57, através da utilização do MHV-A59, conforme previamente padronizado (J. C. Pimenta et al., 2024). Camundongos foram infectados com 10^5 UFP de MHV-A59 de forma intranasal, e foram avaliados os efeitos do tratamento com o DFMA de maneira similar ao previamente apresentado para o MHV-3.

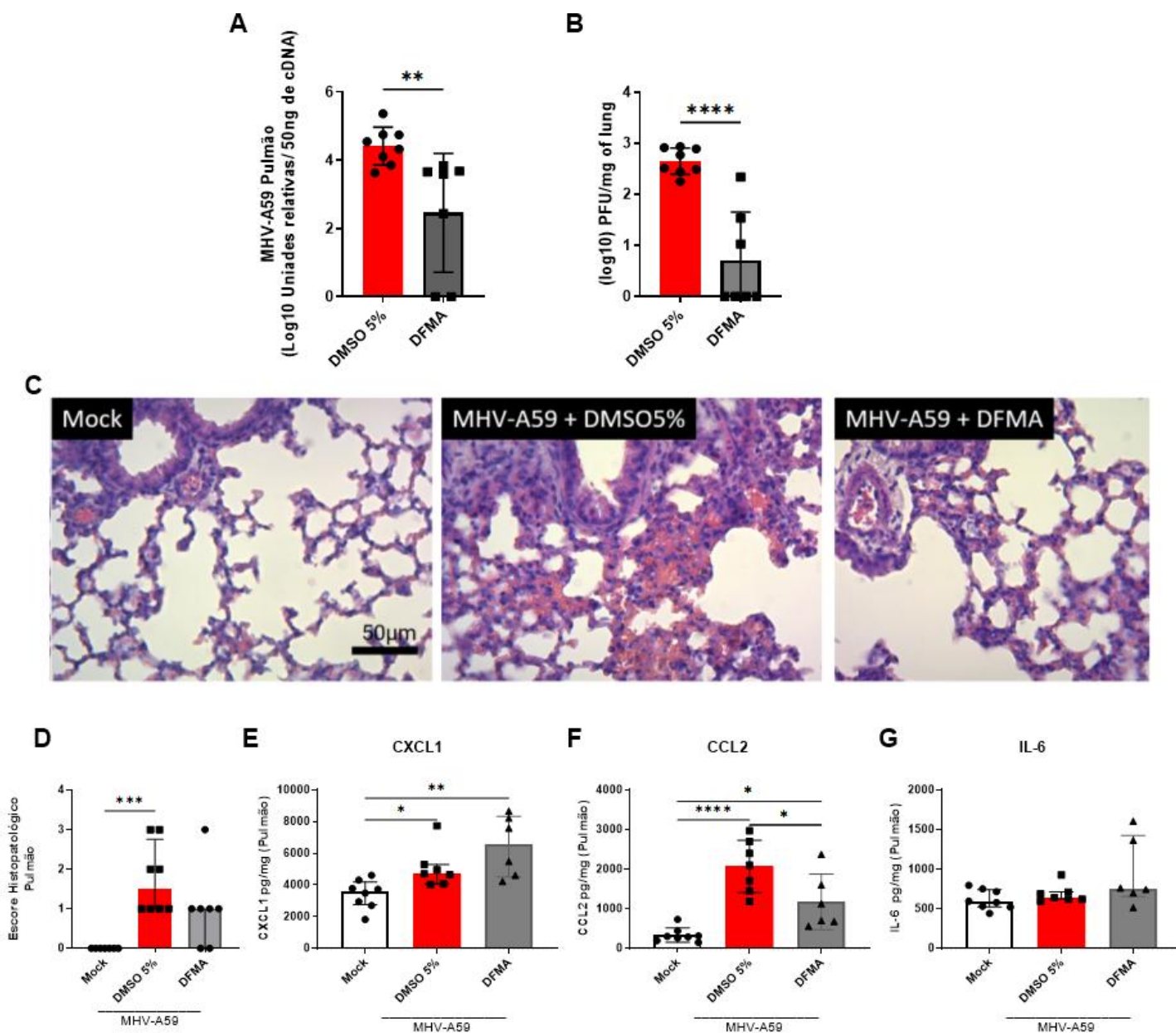
Camundongos infectados pelo MHV-A59 apresentaram um alto número de cópias de RNA viral nos pulmões, medido por RT-qPCR, após dois dias de infecção (Fig. 16A). O tratamento com DFMA em animais infectados, mais uma vez, levou à diminuição da quantificação de cópias de RNA viral (Fig. 16A). Além disso, foi observado que os animais infectados apresentaram vírus viáveis nos tecidos pulmonares, quantificados por titulação (Fig. 16B). Interessantemente, o tratamento com DFMA também foi capaz de reduzir a quantificação de partículas virais viáveis nesses tecidos (Fig. 16B).

Imagens representativas de cortes histológicos de pulmão foram obtidas, mostrando um grande infiltrado inflamatório nos tecidos pulmonares dos camundongos infectados não tratados, o que não foi observado nos camundongos tratados com DFMA (Fig. 16C). A infecção levou a um aumento dos escores inflamatórios nos pulmões dos camundongos não tratados, embora não tenha alcançado significância estatística quando comparado ao grupo tratado com DFMA (Fig. 16D).

Além de quantificar a carga viral e confirmar que, mais uma vez, o DFMA exerceu atividade antiviral no contexto da infecção por MHV-A59, sua capacidade de melhorar os parâmetros inflamatórios também foi analisada. A infecção por MHV-A59 foi associada a um aumento da quimiocina CXCL1 tanto nos pulmões de camundongos infectados não tratados quanto tratados com DFMA (Fig. 16E). Ao avaliar a quimiocina CCL2, foi observado um aumento significativo nos tecidos pulmonares de camundongos não tratados, induzido pela infecção com MHV-A59. No entanto, o tratamento com o DFMA resultou em níveis reduzidos dessa quimiocina (Fig. 16F). Não foram detectadas diferenças entre os grupos na quantificação de IL-6 (Fig. 16G).

Figura 16. Efeitos do DFMA contra o MHV-A59 in vivo.

Camundongos foram tratados seguindo o mesmo protocolo utilizado anteriormente para o MHV-3. Os camundongos foram infectados com MHV-A59 e divididos em grupos, com ou sem tratamento com DFMA. Dois dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e as amostras foram coletadas para análises. A carga viral nos pulmões foi quantificada por RT-qPCR e expressa como Unidades Relativas / 50 ng de cDNA (A) além da quantificação de partículas virais viáveis por titulação, expresso em UFP/mg (B). As análises histológicas representativas do tecido pulmonar destacam infiltrados inflamatórios e hemorragia em camundongos infectados não tratados (C), com uma análise de escore histopatológico representada em (D). Os níveis das quimiocinas CXCL1 (E) e CCL2 (F), juntamente com a citocina IL-6 (G), foram também quantificados em amostras de tecido pulmonar. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para o gráfico (F), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para os gráficos (D), (E) e (G); Teste T foi empregado em análises envolvendo apenas dois grupos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001. n = 7-8.



As análises do sangue demonstraram que a infecção pelo MHV-A59 levou a uma

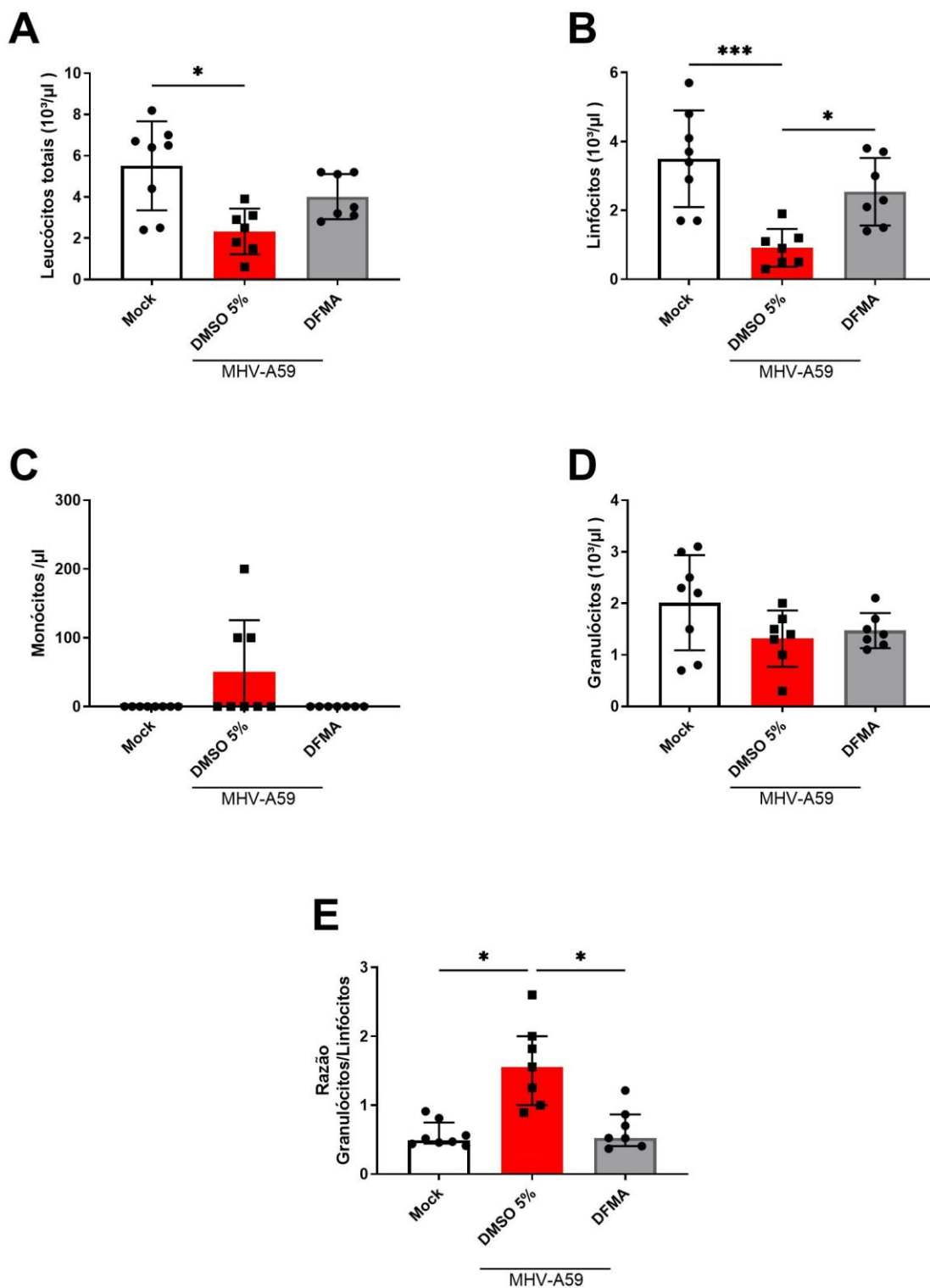
diminuição de leucócitos totais em animais não tratados, não havendo diferença significativa com relação aos animais tratados com o DFMA (Fig. 17A). Além disso, a infecção pelo MHV-A59 levou a uma queda na quantificação de linfócitos no sangue de animais não tratados. O tratamento com o DFMA foi capaz de reverter essa diminuição de leucócitos relacionada à infecção pelo MHV-A59 (Fig. 17B). Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados na quantificação de monócitos (Fig. 17C) e granulócitos (Fig. 17D).

A infecção por MHV-A59 levou a um aumento na razão Granulócitos/Linfócitos. Neste modelo, o tratamento com DFMA foi capaz de reduzir de forma significativa essa razão em comparação aos camundongos não tratados (Fig. 17E).

Figura 17. Efeitos do tratamento com DFMA contra a infecção por MHV-A59 *in vivo*.

Camundongos foram tratados seguindo o mesmo protocolo utilizado anteriormente para o MHV-3. Os camundongos foram infectados com MHV-A59 e divididos em grupos, com ou sem tratamento com DFMA. Dois dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e as amostras de sangue foram coletadas para análises. *Foi feito análises do sangue dos animais para leucócitos totais (A), quantificação de linfócitos (B), monócitos (C), granulócitos (D) e a razão entre granulócitos e linfócitos (E). As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando One-way ANOVA seguido do pós-teste*

Tukey para os gráficos (B) e (D); Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para os gráficos (A), (C) e (E) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. $n = 6-8$.



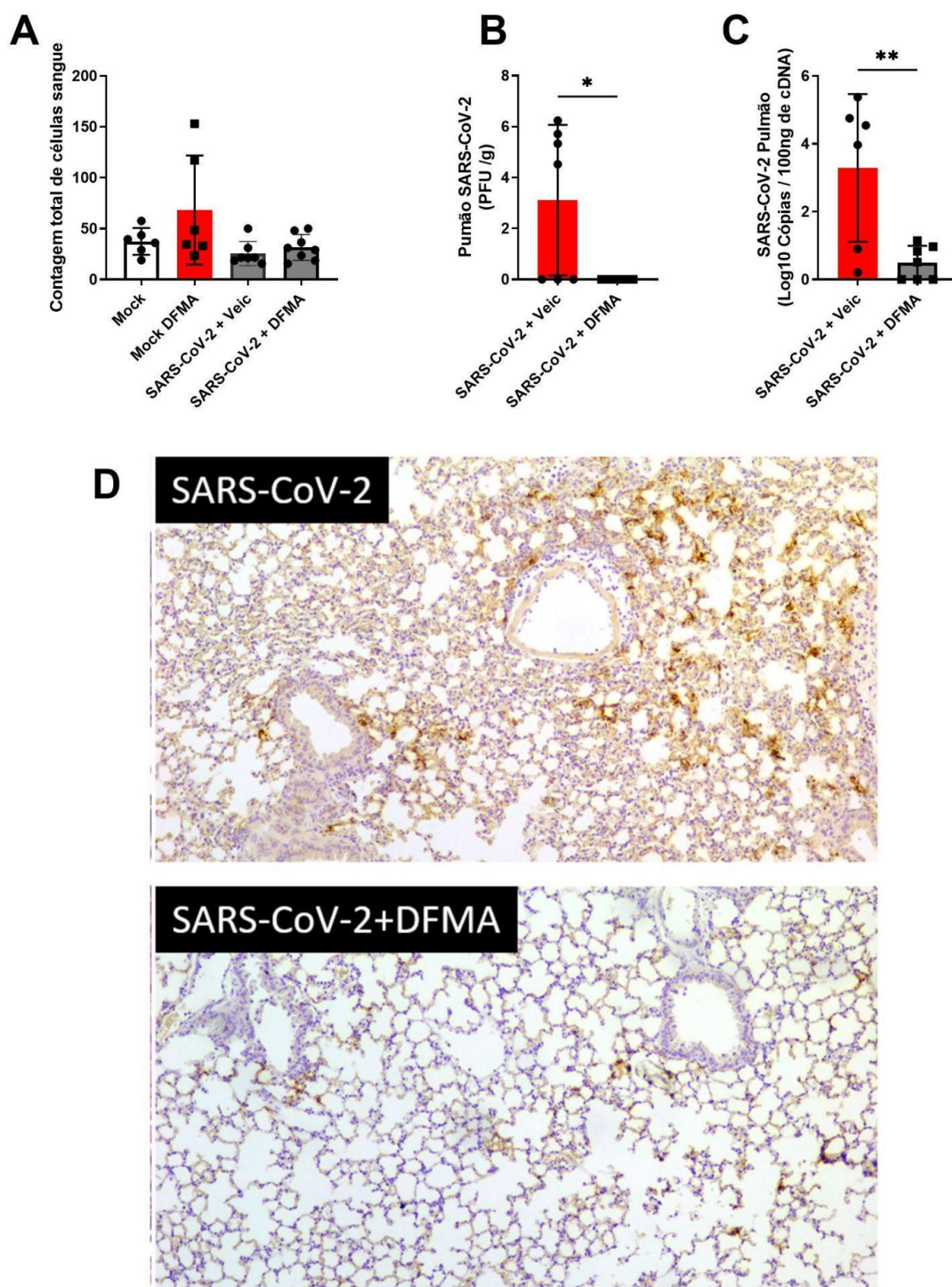
4.8 Avaliação da capacidade antiviral do DFMA contra o SARS-CoV-2 em camundongos K18hACE2.

Um experimento *in vivo* foi realizado utilizando camundongos K18-Human ACE2 infectados com 10^4 UFP do vírus SARS-CoV-2 por via intranasal. Os animais foram tratados em protocolo similar ao descrito para o MHV-3/MHV-A59, sendo iniciado o protocolo de tratamento dois dias antes do momento da infecção e eutanasiados três dias após a infecção. Não houve diferenças na contagem de células totais entre os grupos analisados (Fig. 18A).

A infecção de animais não tratados levou a uma alta recuperação de partículas virais viáveis quantificada por titulação (Fig. 18B) além da detecção de cópias de RNA viral, conforme avaliado por RT-qPCR (Fig. 18C). De maneira interessante, o tratamento com o DFMA novamente foi capaz de reduzir significativamente tanto o número de partículas viáveis (Fig. 18B), quanto o número de cópias de RNA viral (Fig. 18C) recuperadas nos pulmões de animais infectados. Os dados de quantificação viral no pulmão dos animais foram demonstrados de forma representativa por imunohistoquímica com a coloração da proteína Spike do SARS-CoV-2 (Fig. 19D), validando todos os resultados anteriores e apresentando efetivamente o DFMA como um potencial antiviral para diferentes coronavírus.

Figura 18. Efeito do tratamento com DFMA na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE2.

Camundongos K18-hACE2 foram tratados com 10 mg/kg de DFMA duas vezes ao dia, começando dois dias antes da infecção e seguindo até o segundo dia pós-infecção. Os camundongos foram eutanasiados no terceiro dia pós-infecção. Foi quantificado as células totais no sangue de camundongos (A). A carga viral nos pulmões foi quantificada através da titulação viral (B) do número de cópias de RNA viral utilizando RT-qPCR (C). O tecido pulmonar foi coletado para análise histológica, com a coloração imunohistoquímica da proteína Spike do SARS-CoV-2. As diferenças entre os grupos foram analisadas usando o Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para (A). Para comparações envolvendo apenas dois grupos, foi utilizado o Teste T. *P < 0,05; **P. n = 7-8.



Assim como na infecção por MHV, além dos resultados da carga viral, cortes histológicos dos pulmões revelaram um substancial infiltrado inflamatório nos tecidos pulmonares de camundongos infectados não tratados (Fig. 19A). Camundongos infectados mostraram um aumento significativo nos escores inflamatórios pulmonares,

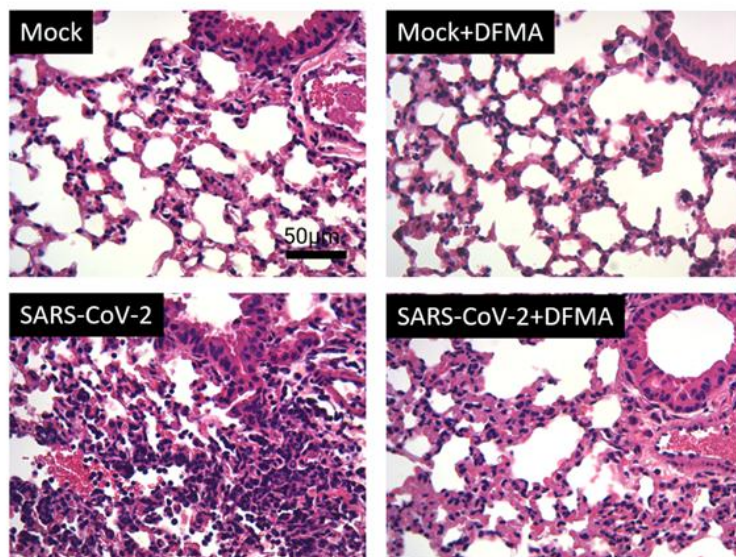
mas o tratamento com DFMA não apresentou significância estatística para tal parâmetro (Fig. 19B).

Além disso, a quantificação de mediadores inflamatórios nos tecidos pulmonares de camundongos infectados com SARS-CoV-2 também foi avaliada, e não foram observadas diferenças nos níveis de CXCL1 entre os grupos (Fig. 19C). Por outro lado, se tratando da quimiocina CCL2, foi observado um aumento significativo nos pulmões de animais infectados pelo SARS-CoV-2 (Fig. 19D). No entanto, o tratamento com DFMA foi capaz de reduzir significativamente os níveis pulmonares de CCL2, retornando-os a níveis basais (Fig. 19D). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos para a citocina IL-6 (Fig. 19E).

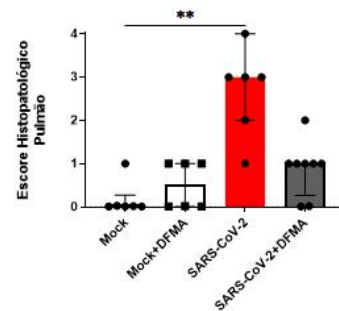
Figura 19. Parâmetros inflamatórios pulmonares do tratamento com DFMA na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE2.

Camundongos K18-hACE2 foram tratados com 10 mg/kg de DFMA duas vezes ao dia, começando dois dias antes da infecção e seguindo até o segundo dia pós-infecção. Os camundongos foram eutanasiados no terceiro dia pós-infecção. Imagens histológicas representativas mostram infiltrado inflamatório em camundongos infectados não tratados (A). O escore inflamatório pulmonar também foi avaliado (B), juntamente com a quantificação de mediadores inflamatórios, incluindo CXCL1 (C), CCL2 (D) e IL-6 (E). One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para o gráfico (D), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para os gráficos (B), (C) e (E); Teste T foi empregado em análises envolvendo apenas dois grupos. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001. n = 7–8

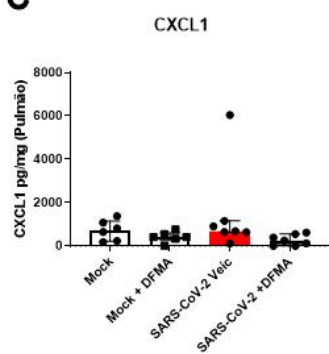
A



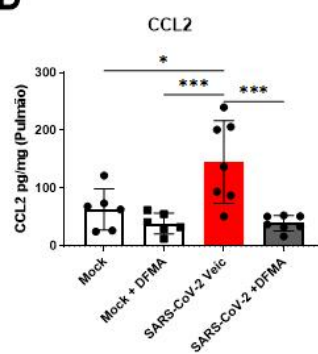
B



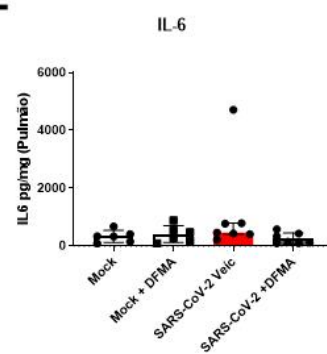
C



D



E



5. Discussão

A família *Coronaviridae* inclui vários vírus capazes de infectar humanos, pássaros, roedores e outras espécies (Su et al., 2016). Alguns coronavírus são globalmente distribuídos e capazes de causar infecções respiratórias leves em humanos, como o 229E, OC43, NL63, e HKU1 (Su et al., 2016). Além de infecções leves, os coronavírus também foram responsáveis por epidemias significativas que levaram a graves quadros respiratórias ao longo dos últimos 20 anos, como a síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada pelo SARS-CoV (OMS, 2003), resultando em impactos econômicos, sociais e de saúde pública (Qiu et al., 2018); a Síndrome Respiratória do Oriente Médio causada pelo MERS-CoV; e mais recentemente, em 2019, a COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2.

A COVID-19 tem se mostrado uma doença de impacto profundo e duradouro. Além das fatalidades diretas atribuídas à doença e da consequente pressão sobre os sistemas de saúde em todo o mundo, ela exerce uma influência significativa em diversas dimensões socioeconômicas (Nicola et al., 2020). Notavelmente, os sintomas agudos da COVID-19 não são os únicos aspectos de interesse dessa síndrome. Há também o que vem sendo chamado de COVID longa, uma síndrome multissistêmica e heterogênea caracterizada por várias alterações prolongadas que vão além das complicações pulmonares agudas inicialmente relatadas. Estudos demonstram que os sintomas e consequências associados à infecção por SARS-CoV-2 podem persistir por meses, potencialmente levando a sequelas irreversíveis e irreparáveis em muitas áreas (Davis et al., 2023; Monje & Iwasaki, 2022; Silva et al., 2021; Xie et al., 2022).

Atualmente, existem vacinas aprovadas em caráter emergencial que desempenharam um papel significativo na redução e mitigação dos casos da doença (Zheng et al., 2021). Uma grande preocupação é o surgimento de novas variantes que apresentam alterações, particularmente relacionadas à proteína Spike viral, que têm sido associadas à evasão imune e ao aumento da transmissibilidade (Bhattacharya et al., 2021; Cromer et al., 2022; R. Li et al., 2021; Rössler et al., 2021; Viana et al., 2022; P. Wang et al., 2021) (Willett et al., 2022; Xin Zhao et al., 2022).

É indiscutível que a família *Coronaviridae* já apresentou historicamente diversos representantes com grande potencial de causar sérios impactos em nossa sociedade. A pandemia de COVID-19 destaca mais uma vez a necessidade da busca por novas moléculas capazes de reduzir ou até interromper o ciclo de multiplicação do vírus tornando-se imprescindível a busca por antivirais não apenas contra o SARS-CoV-2, mas também contra outros coronavírus, visando uma possível utilização também em futuras epidemias causadas por membros dessa família.

Neste trabalho, avaliamos a atividade antiviral de diferentes compostos e moléculas contra o coronavírus murino MHV não somente como um modelo experimental e ferramenta de estudo, mas como uma prova de conceito de validação dos testes de potenciais antivirais para outros coronavírus que não o SARS-CoV-2.

O MHV, assim como o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, é um betacoronavírus que infecta naturalmente camundongos, sendo capaz de causar hepatite, que pode evoluir para a letalidade desses animais (Lucchiari et al., 1992). Trabalhar com o MHV exige laboratórios e biotérios de nível de biossegurança 2 (NB-2), ao contrário do vírus SARS-CoV-2, que requer laboratórios de nível de biossegurança 3 (NB-3), o que o torna ainda uma ótima ferramenta para *screening* de potenciais candidatos antivirais, uma vez que a disponibilidade de laboratórios e biotérios com nível 3 de biossegurança foi um dos maiores problemas enfrentados nos semestres iniciais deste trabalho.

Conforme demonstrado pelo nosso grupo, o MHV-3 é capaz de causar danos pulmonares quando inoculado por via intranasal (Andrade et al., 2021), sendo utilizado como modelo capaz de mimetizar alterações pulmonares e sistêmicas comumente observadas em casos graves de COVID-19 (Campolina-Silva et al., 2023; Oliveira et al., 2024; J. Pimenta et al., 2023). Sendo assim, como estratégia experimental, primeiramente, realizamos testes de potenciais compostos *in vitro* contra os vírus MHV-3/MHV-A59 dentro de laboratórios NB-2, evoluindo para testes *in vitro contra o SARS-CoV-2*. Posteriormente, o candidato mais promissor selecionado foi exposto a testes *in vivo* contra os vírus MHV-3/MHV-A59. Por último, seguimos para testes *in vivo* contra o vírus SARS-CoV-2 conforme a demonstração de resultados promissores.

O primeiro potencial antiviral a ser testado foi a Baicalina, um flavonoide metabólito da Baicaleína. Os dados obtidos em nossos experimentos com o uso dos flavonóides não apresentaram resultados promissores, sem efeito algum nos títulos virais presentes no sobrenadante de células infectadas pelo MHV-3 na presença da baicalina ou baicaleína. Em outros estudos, já foi demonstrado que a baicalina apresentou promissores efeitos antivirais, com uma alta atividade virucida contra partículas extracelulares de DENV-2 e mostrou ainda, efeito anti-adsorção em células Vero (Moghaddam et al., 2014). Além disso, o efeito antiviral da Baicalina também foi demonstrado *in vitro* para o vírus Chikungunya, como demonstrado por Oo e colaboradores (2018), em que a baicalina apresentou efeitos mais promissores quando adicionada juntamente com o vírus, ou nas primeiras horas após o inóculo viral, apresentando ainda, um efeito ainda maior quando adicionado 2 horas antes do inóculo viral, com capacidade de redução de 93% na produção viral. Estes resultados sugeriram que a baicalina foi capaz de afetar, principalmente, os estágios iniciais da infecção pelo CHIKV (Oo et al., 2018). Em um outro estudo, foi analisada a potencial atividade antiviral da baicaleína contra o vírus Influenza *in vivo*. Neste trabalho, Xu e colaboradores (2010) demonstraram um interessante efeito antiviral da administração oral da Baicaleína, dependente da concentração sérica de seu metabólito, a baicalina (Xu et al., 2010). Sendo assim, e sabendo que a concentração máxima de baicalina no soro de pacientes que tiveram a administração de 360mg de baicalina intravenosa chega a, no máximo, 74 µg/ml (equivalente a 170 µM) (F. Chen et al., 2004), decidimos por não avançarmos a baicaleína ou a baicalina para testes utilizando o vírus SARS-CoV-2, uma vez que não observamos efeito antiviral *in vitro* nas concentrações de até 100 µM neste presente estudo utilizando o vírus MHV-3.

Após não observarmos resultados satisfatórios para evolução do teste da Baicalina ou baicaleína para testes contra o SARS-CoV-2, conforme havia sido definido pelo plano de trabalho previamente estabelecido, foi publicado um trabalho demonstrando os efeitos da Baicalina e Baicaleína *in vitro* para o vírus SARS-CoV-2 por outro grupo de pesquisadores (Zandi et al., 2021). Neste trabalho, tanto a baicaleína, quanto seu metabólito apresentaram atividade antiviral *in vitro*, cujo mecanismo proposto seria diferente, através da ligação na RdRp, sendo capaz de inibir a sua ação enzimática (Zandi et al., 2021). Posteriormente, foi ainda demonstrado *in vivo* efeitos benéficos do uso da Baicaleína, em que animais infectados com o SARS-CoV-2 e tratados com

a molécula apresentaram ganho de peso, comparado com animais infectados não tratados que perderam peso durante o experimento, além de menores cargas virais no pulmão e menores danos pulmonares quando tratados em comparação com o grupo não tratado (Song et al., 2021). Um outro trabalho lançado logo em seguida mostrou uma inibição completa do vírus SARS-CoV-2 em concentrações a partir de 25 μM de Baicalina (Ngwe Tun et al., 2022).

Sabíamos que enfrentaríamos desafios associados ao plano de trabalho previamente estabelecido, que consistia em testar inicialmente os compostos no vírus MHV para, posteriormente, evoluir para o SARS-CoV-2. É inevitável reconhecer que algumas moléculas, como a baicalina e a baicaleína, poderiam apresentar eficácia contra o SARS-CoV-2, mesmo sem apresentar efeitos significativos contra o MHV. No entanto, devido à ausência de um laboratório NB3 nos primeiros semestres, essa abordagem experimental foi adotada como uma alternativa necessária.

O segundo grupo de compostos testados neste estudo foi o peptídeo AH-D. Já foi demonstrado por Jackman e colaboradores (2018) que este peptídeo demonstrou atividade com alta capacidade de ruptura de lipossomos de 300nm ou menores quando em concentração do peptídeo de 100nM, valor bem abaixo do limiar citotóxico do peptídeo que teve o valor de CC50 de 63.44 μM . Neste mesmo trabalho, o foi AH-D teve o seu efeito virucida relatado, em que o vírus em MOI definida foi exposto juntamente a diferentes concentrações do AH-D por 1 hora e posteriormente incubado a 37°C. Após a incubação, o inóculo foi adicionado à monocamada de células. A atividade do peptídeo AH-D foi demonstrada para diversos arbovírus envelopados por ensaio de neutralização, sendo eles: DENV, vírus da encefalite japonês (JEV), vírus Chikungunya (CHIKV), vírus da febre amarela (YFV), além do vírus da Zika (ZIKV), com IC₅₀ variando de 11–206 nM. O tratamento terapêutico com o AH-D *in vivo* foi capaz de resultar na diminuição da carga viral e conseqüentemente da mortalidade, associada a infecção pelo ZIKV (Jackman et al., 2018). Um outro trabalho demonstrou que o uso do peptídeo AH-D em fêmeas grávidas infectadas por ZIKV resultou em diminuição significativa do número de filhotes em que foi detectado cópias de RNA viral após o nascimento da prole, resultando ainda em uma redução de 21% na morte fetal de filhotes vindos de fêmeas tratadas (Camargos et al., 2019).

Aqui, pudemos avaliar um efeito antiviral significativo em concentrações a partir de

50nM, em que relatamos a diminuição da quantificação de partículas virais viáveis do MHV-3 detectadas no sobrenadante de células L929. Além disso, o AH-D também foi capaz de reverter a perda de viabilidade celular induzida pela infecção e melhorar os parâmetros de morte celular. Ao realizar um teste piloto com o SARS-CoV-2, o AH-D apresentou um efeito significativo de diminuição de partículas virais viáveis presentes no sobrenadante somente quando o inóculo viral foi incubado previamente em concentrações a partir de 125nM, estando ainda bem abaixo do valor capaz de levar a citotoxicidade relatado por Jackman e colaboradores (2018).

Por último, avaliamos o potencial papel antiviral do análogo de nucleosídeo DFMA. A molécula atua se ligando de forma análoga, mas não funcional, ao sítio ativo da RdRp viral. Em outros trabalhos, o tratamento com o DFMA foi capaz de reduzir o número de cópias de RNA viral do sobrenadante de células infectadas com DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, como publicado por Zandi e colaboradores (2019). Neste mesmo trabalho, análises *in vivo* demonstraram uma capacidade do DFMA de diminuir os títulos virais de partículas viáveis no plasma, baço, fígado e cérebro quando administrado na dose de 10mg/Kg/dia a partir da data da infecção em camundongos A129, além de estar associado a melhorias sistêmicas, como de menor dano tecidual, recuperação dos níveis de plaquetas e menores quantificação de mediadores inflamatórios lançados sistemicamente (Zandi et al., 2019). Já foi relatado, em um trabalho publicado por Zmurko e colaboradores (2016), dosagens 5 vezes maiores de um análogo de nucleosídeo similar ao DFMA, quando comparada a dosagem utilizada por Zandi e colaboradores (2019). Isto nos leva a crer que aumentar a dose seria capaz de levar a efeitos mais robustos.

A promissora atividade antiviral do DFMA foi também relatada por Del Sarto e colaboradores (2020), demonstrando que o análogo de nucleosídeo DFMA foi capaz de inibir a replicação viral e a neuroinflamação induzida pelo *Zika vírus in vivo*, além de reduzir a letalidade em camundongos deficientes para receptores de Interferon tipo I (^{A129})(Del Sarto et al. 2020). Até então, o DFMA havia sido testado apenas contra flavivírus, que geralmente possuem uma enzima RdRp conservada entre eles, sendo considerada um excelente alvo para o desenvolvimento de antivirais (Lim et al., 2015; Rawlinson et al., 2006). Além disso, um análogo de nucleosídeo similar ao DFMA também apresentou um efeito antiviral promissor contra o vírus da febre amarela YFV (LeCher JC et al., 2022). Esses resultados sugerem que o DFMA poderia vir a exercer

efeito semelhante contra membros da família *Coronaviridae*, dado que todos os vírus mencionados são envelopados de RNA fita simples e senso positivo.

Nossos dados demonstraram que o DFMA se apresentou como um promissor antiviral, uma vez que de início foi capaz de reduzir os títulos dos vírus MHV-3 e MHV-A59, diminuindo a quantificação viral no sobrenadante de células L929 infectadas a partir de 10 μ M, semelhante ao observado contra o ZIKV, conforme demonstrado por Del Sarto et al (2020) onde o DFMA também foi capaz de reduzir as concentrações dos títulos virais em concentrações a partir de 10 μ M. O DFMA apresentou excelentes resultados *in vitro* contra o SARS-CoV-2, com um índice de seletividade de 6,2, o que nos levou a avançar para os estudos *in vivo*. Com isso, as análises avançaram para experimentos *in vivo*, utilizando um protocolo de tratamento semelhante ao empregado em outros estudos (Del Sarto et al., 2020a; Zandi et al., 2019). O DFMA reduziu significativamente a carga viral nos pulmões de camundongos em todos os três modelos de infecção: MHV-3, MHV-A59 e SARS-CoV-2, conforme avaliado e quantificado por qPCR.

Além dos dados demonstrados da ação antiviral do DFMA, os resultados apresentaram ainda que a redução da carga viral também esteve associada a uma diminuição na produção de diferentes mediadores inflamatórios, quando quantificados nos pulmões em todos os modelos de infecção testados, bem como no soro de camundongos tratados no modelo experimental de COVID-19 grave de MHV-3. Como relatado em nossas descobertas com o uso do DFMA, a redução de mediadores inflamatórios nos pulmões de camundongos K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2 também foi previamente relatada com a administração de molnupiravir, uma molécula antiviral já aprovada como medicamento contra o SARS-CoV-2 (Papinia et al., 2024).

Os dados demonstram que, em um modelo de COVID-19 grave utilizando o MHV-3, embora o DFMA tenha reduzido a carga viral e os mediadores inflamatórios, não houve uma redução significativa na razão granulócito/linfócito. No entanto, no modelo de COVID-19 leve, o DFMA reduziu significativamente a razão granulócito/linfócito aumentada em animais infectados não tratados. No auge da pandemia de COVID-19, a razão granulócitos/linfócitos foi considerada um importante marcador capaz de prever o prognóstico de pacientes (Chan & Rout, 2020; X. Li et al., 2020). O fato de

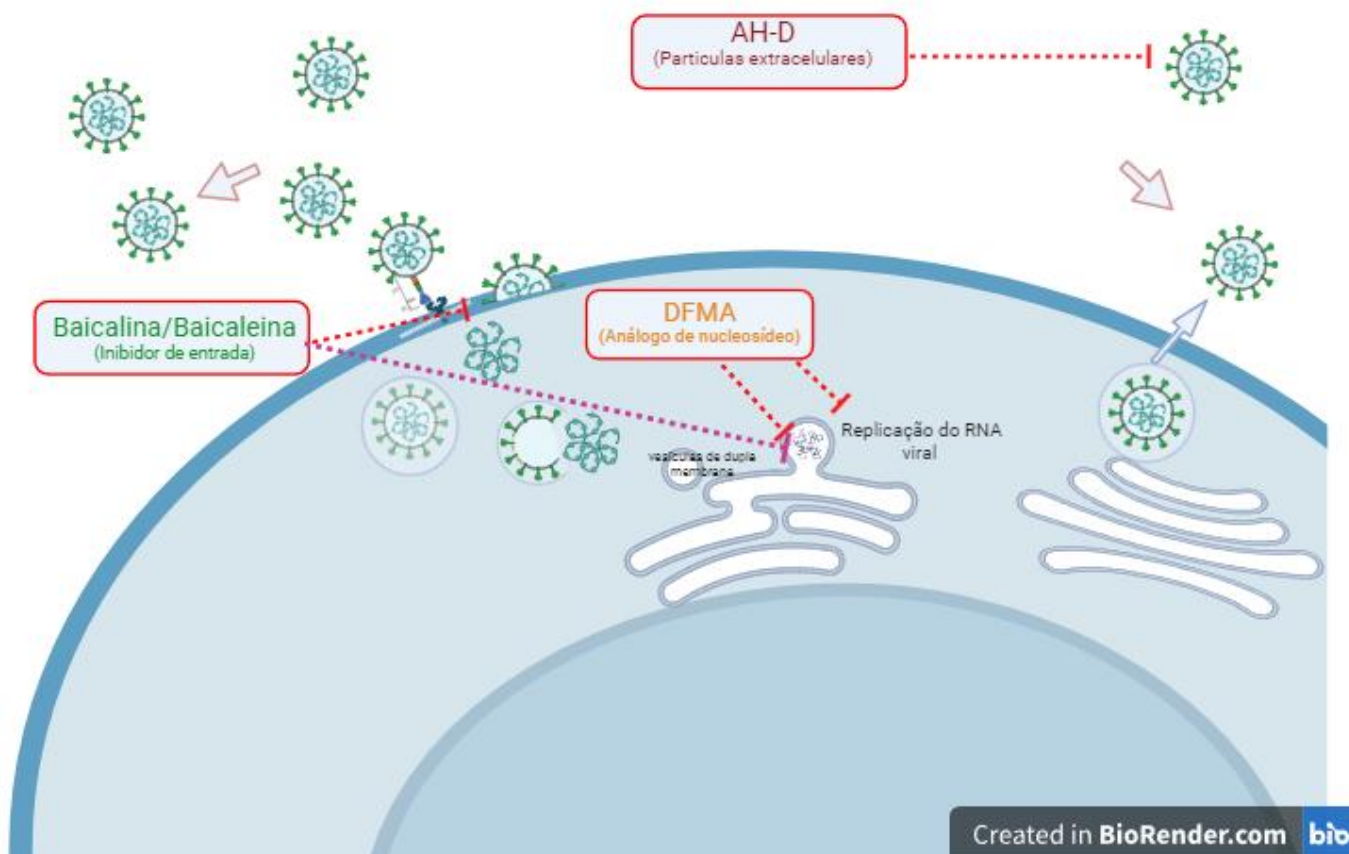
não haver diferenças no modelo de COVID-19 mais grave utilizando o MHV-3, levanta a possibilidade de que possamos avaliar os efeitos do tratamento com o DFMA em sinergia com algum medicamento pró-resolutivo que possa potencializar ainda mais os efeitos prognósticos e sistêmicos, uma vez que a inflamação exacerbada e a tempestade de citocinas também são consideradas fatores-chave na evolução de pacientes com COVID-19 grave.

Em conclusão, apresentamos um "graphical abstract" (Fig. 20A) dos mecanismos antivirais propostos para cada composto testado, ilustrando as etapas do ciclo replicativo do coronavírus MHV/SARS-CoV-2 e os pontos de intervenção de cada antiviral. Um organograma destaca, com "V", aqueles que avançaram nos testes e, com "X", aqueles que foram descontinuados, ou estão com testes em andamento (Fig. 21 B). O DFMA apresentou resultados mais promissores em relação à sua ação antiviral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, contra o MHV-3, MHV-A59 e o SARS-CoV-2. O fato de diferentes membros da família *Coronaviridae* terem sido testados sugere que o DFMA pode ser um excelente candidato contra futuros coronavírus que possam emergir nos próximos anos. Estudos adicionais de fase 1 e 2 precisam ser realizados para confirmar a segurança e possível uso do DFMA em humanos. Além disso, os dados apresentados para o peptídeo AH-D também mostram uma promissora atividade virucida a ser considerada para futuros testes de eficácia *in vivo* contra coronavírus. Além disso, as conclusões deste trabalho demonstram o grande potencial do uso do MHV-3 e do MHV-A59 como plataformas para a triagem de potenciais medicamentos antivirais contra coronavírus, embora deve-se levar em consideração o mecanismo de ação proposto.

Figura 20. Ilustração do trabalho apresentando o mecanismo de ação proposto para cada composto testado.

(A) "Graphical abstract" do mecanismo antiviral proposto para cada potencial composto testado neste trabalho. Na imagem, em vermelho, é apontado em qual fase do ciclo de replicação viral propúnhamos que o agente proposto atuaria. Em roxo, destaca-se a outros outro mecanismo de ação posteriormente apresentado em outros trabalhos, como é o caso da baicalina e baicaleína. Na imagem é possível observar partículas extracelulares do coronavírus MHV/SARS-CoV-2, fase na qual o peptídeo AH-D atuaria como antiviral. O ciclo do vírus se inicia com o vírus entrando na célula, momento em que a baicaleína ou seu metabolito teria ação antiviral, como previamente havia sido relatada para outros vírus. O material genético viral é liberado e dá início a tradução de proteínas não estruturais que auxiliam a formação das vesículas de dupla membrana e organela de replicação no retículo endoplasmático, onde o DFMA atua como análogo de nucleosídeos e posteriormente foi demonstrado,

em outros trabalhos, o efeito dos flavonoides testados. Em seguida, proteínas estruturais são traduzidas e se translocam entre as membranas do RE para o Golgi, onde se juntam a gRNAs virais produzidas, formando novas partículas virais que saem da célula por exocitose. **(B)** Organograma de compostos testados. “V” demonstra que o teste em questão já foi realizado e “X” demonstra que não demos continuidade aos testes.

A

B

	Baicalina	Baicaleina	AH-D	DFMA
Testes <i>in-vitro</i> MHV-3	✓	✓	✓	✓
Testes <i>in-vitro</i> SARS-CoV-2	X	X	✓	✓
Testes <i>in-vivo</i> MHV-3	X	X	X	✓
Testes <i>in-vivo</i> SARS-CoV-2	X	X	X	✓

7. Referências Bibliográficas

Almeida PRJ, Periard AM, Tana FL, Avila RE, Milhorato LB, Alcantara KMM, Resende CB, Serufo AV, Santos FR, Teixeira DC, Queiroz-Junior CM, Fonseca TCM, Silva BLV, Costa VV, Souza RP, Perretti M, Jonassen TEN, Teixeira MM. Effects of a pro-resolving drug in COVID-19: preclinical studies to a randomized, placebo-controlled, phase Ib/IIa trial in hospitalized patients. *Br J Pharmacol*. 2024 Aug 19. doi: 10.1111/bph.17322. Epub ahead of print. PMID: 39159951.

Andrade, A. C. dos S. P., Campolina-Silva, G. H., Queiroz-Junior, C. M., Oliveira, L. C. de, Lacerda, L. de S. B., Gaggino, J. C. P., Souza, F. R. O. de, Chaves, I. de M., Passos, I. B., Teixeira, D. C., Bittencourt-Silva, P. G., Valadão, P. A. C., Rossi-Oliveira, L., Antunes, M. M., Figueiredo, A. F. A., Wnuk, N. T., Jairo R. Temerozo, E., Ferreira, A. C., Cramer, A., ... Costaa, V. V. (2021). *PATHOGENESIS AND IMMUNITY A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus- Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations*. September, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JVI.01276-21>.

Báez-santos, Y. M., John, S. E. S., & Mesecar, A. D. (2015). The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral

compounds COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information website . Elsevier hereby grants permission t. *Antiviral Research*, 115(1), 21–38.

- Bauer, R. N., Teterina, A., Shivram, H., McBride, J., Rosenberger, C. M., Cai, F., Bao, M., Tsai, L., Gordon, O., Lee, I. T., Wallin, J. J., Porter, D., Juneja, K., Camus, G., Rosas, I. O., & Wildum, S. (2023). Prognostic value of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 viral load and antibodies in patients hospitalized with COVID-19. *Clinical and Translational Science*, 16(6), 1049–1062. <https://doi.org/10.1111/cts.13511>
- Bhatt, P. R., Scaiola, A., Loughran, G., Leibundgut, M., Kratzel, A., Meurs, R., Dreos, R., O'Connor, K. M., McMillan, A., Bode, J. W., Thiel, V., Gatfield, D., Atkins, J. F., & Ban, N. (2021). Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, 372(6548), 1306–1313. <https://doi.org/10.1126/science.abf3546>
- Brown, A. J., Won, J. J., Graham, R. L., Dinnon, K. H., Sims, A. C., Feng, J. Y., Cihlar, T., Denison, M. R., Baric, R. S., & Sheahan, T. P. (2019). Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Research Journal*, 169(January).
- Bull-Otterson, L., Saydah, S. B. S., Boehmer, T. K., Adjei, S., Gray, S., & Harris, A. M. (2022). Post-COVID Conditions Among Adult COVID-19 Survivors Aged 18–64 and ≥65 Years. *Morbidity and Mortality Weekly Report Post-COVID*, 71(21), 713–717. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7121e1>
- Camargos, V. N., Foureaux, G., Medeiros, D. C., da Silveira, V. T., Queiroz-Junior, C. M., Matosinhos, A. L. B., Figueiredo, A. F. A., Sousa, C. D. F., Moreira, T. P., Queiroz, V. F., Dias, A. C. F., Santana, K. T. O., Passos, I., Real, A. L. C. V., Silva, L. C., Mourão, F. A. G., Wnuk, N. T., Oliveira, M. A. P., Macari, S., ... Souza, D. G. (2019). In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine*, 44, 516–529. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.014>

- Campbell, F., Archer, B., Laurenson-Schafer, H., Jinnai, Y., Konings, F., Batra, N., Pavlin, B., Vandemaele, K., Van Kerkhove, M. D., Jombart, T., Morgan, O., & De Waroux, O. L. P. (2021). Increased transmissibility and global spread of SARSCoV- 2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance*, *26*(24), 1–6. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509>
- Campolina-Silva, G., Andrade, A. C. dos S. P., Couto, M., Bittencourt-Silva, P. G., Queiroz-Junior, C. M., Lacerda, L. de S. B., Chaves, I. de M., de Oliveira, L. C., Marim, F. M., Oliveira, C. A., da Silva, G. S. F., Teixeira, M. M., & Costa, V. V. (2023). Dietary Vitamin D Mitigates Coronavirus-Induced Lung Inflammation and Damage in Mice. *Viruses*, *15*(12). <https://doi.org/10.3390/v15122434>
- Cao, Y., Wang, J., Jian, F., Xiao, T., Song, W., Yisimayi, A., Huang, W., Li, Q., Wang, P., An, R., Wang, J., Wang, Y., Niu, X., Yang, S., Liang, H., Sun, H., Li, T., Yu, Y., Cui, Q., ... Xie, X. S. (2022). Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, *602*(7898), 657–663. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04385-3>
- Carabelli, A. M., Peacock, T. P., Thorne, L. G., Harvey, W. T., Hughes, J., de Silva, T. I., Peacock, S. J., Barclay, W. S., de Silva, T. I., Towers, G. J., & Robertson, D. L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*, *21*(3), 162–177. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>
- Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, *39*(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Chen, D., Zheng, Q., Sun, L., Ji, M., Li, Y., Deng, H., & Zhang, H. (2021). ORF3a of SARS-CoV-2 promotes lysosomal exocytosis-mediated viral egress. *Developmental Cell*, *56*(23), 3250-3263.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.006>
- Chen, F., Chan, K. H., Jiang, Y., Kao, R. Y. T., Lu, H. T., Fan, K. W., Cheng, V. C. C., Tsui, W. H. W., Hung, I. F. N., Lee, T. S. W., Guan, Y., Peiris, J. S. M., & Yuen, K. Y. (2004). In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds. *Journal of Clinical Virology*, *31*(1), 69–75.

<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.03.003>

- Chou, S. H. Y., Beghi, E., Helbok, R., Moro, E., Sampson, J., Altamirano, V., Mainali, S., Bassetti, C., Suarez, J. I., & McNett, M. (2021). Global Incidence of neurological manifestations among patients hospitalized with COVID-19 A report for the GCS-NeuroCOVID consortium and the energy consortium. *JAMA Network Open*, 4(5), E2112131. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.12131>
- Cromer, D., Steain, M., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Kent, S. J., Triccas, J. A., Khoury, D. S., & Davenport, M. P. (2022). Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe* 2022; , January, e52–e61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00267-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00267-6)
- Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>
- Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, Pearson CAB, Russell TW, Tully DC, Washburne AD, Wenseleers T, Gimma A, Waites W, Wong KLM, van Zandvoort K, Silverman JD; CMMID COVID-19 Working Group; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium; Diaz-Ordaz K, Keogh R, Eggo RM, Funk S, Jit M, Atkins KE, Edmunds WJ. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021 Apr 9;372(6538):eabg3055. doi: 10.1126/science.abg3055. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33658326; PMCID: PMC8128288.
- Del Sarto, J. L., Rocha, R. de P. F., Bassit, L., Olmo, I. G., Valiate, B., Queiroz-Junior, C. M., Pedrosa, C. da S. G., Ribeiro, F. M., Guimarães, M. Z., Rehen, S., Amblard, F., Zhou, L., Cox, B. D., Gavegnano, C., Costa, V. V., Schinazi, R. F., & Teixeira, M. M. (2020a). 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine inhibits Zika virus infection and viral-induced neuroinflammation. *Antiviral Research*, 180, 104855. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104855>
- Del Sarto, J. L., Rocha, R. de P. F., Bassit, L., Olmo, I. G., Valiate, B., Queiroz-Junior, C. M., Pedrosa, C. da S. G., Ribeiro, F. M., Guimarães, M. Z., Rehen, S., Amblard, F., Zhou, L., Cox, B. D., Gavegnano, C., Costa, V. V., Schinazi, R. F., & Teixeira,

M. M. (2020b). 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine inhibits Zika virus infection and viral-induced neuroinflammation. *Antiviral Research*, 180(June), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104855>

Dhar MS, Marwal R, Vs R, Ponnusamy K, Jolly B, Bhoyar RC, Sardana V, Naushin S, Rophina M, Mellan TA, Mishra S, Whittaker C, Fatihi S, Datta M, Singh P, Sharma U, Ujjainiya R, Bhatheja N, Divakar MK, Singh MK, Imran M, Senthivel V, Maurya R, Jha N, Mehta P, A V, Sharma P, Vr A, Chaudhary U, Soni N, Thukral L, Flaxman S, Bhatt S, Pandey R, Dash D, Faruq M, Lall H, Gogia H, Madan P, Kulkarni S, Chauhan H, Sengupta S, Kabra S; Indian SARS-CoV-2 Genomics Consortium (INSACOG)‡; Gupta RK, Singh SK, Agrawal A, Rakshit P, Nandicoori V, Tallapaka KB, Sowpati DT, Thangaraj K, Bashyam MD, Dalal A, Sivasubbu S, Scaria V, Parida A, Raghav SK, Prasad P, Sarin A, Mayor S, Ramakrishnan U, Palakodeti D, Seshasayee ASN, Bhat M, Shouche Y, Pillai A, Dikid T, Das S, Maitra A, Chinnaswamy S, Biswas NK, Desai AS, Pattabiraman C, Manjunatha MV, Mani RS, Arunachal Udipi G, Abraham P, Atul PV, Cherian SS. Genomic characterization and epidemiology of an emerging SARS-CoV-2 variant in Delhi, India. *Science*. 2021 Nov 19;374(6570):995-999. doi: 10.1126/science.abj9932. Epub 2021 Oct 14. PMID: 34648303; PMCID: PMC7612010

Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, Crispim MAE, Sales FCS, Hawryluk I, McCrone JT, Hulswit RJG, Franco LAM, Ramundo MS, de Jesus JG, Andrade PS, Coletti TM, Ferreira GM, Silva CAM, Manuli ER, Pereira RHM, Peixoto PS, Kraemer MUG, Gaburo N Jr, Camilo CDC, Hoeltgebaum H, Souza WM, Rocha EC, de Souza LM, de Pinho MC, Araujo LJ, Malta FSV, de Lima AB, Silva JDP, Zauli DAG, Ferreira ACS, Schnekenberg RP, Laydon DJ, Walker PGT, Schlüter HM, Dos Santos ALP, Vidal MS, Del Caro VS, Filho RMF, Dos Santos HM, Aguiar RS, Proença-Modena JL, Nelson B, Hay JA, Monod M, Miscouridou X, Coupland H, Sonabend R, Vollmer M, Gandy A, Prete CA Jr, Nascimento VH, Suchard MA, Bowden TA, Pond SLK, Wu CH, Ratmann O, Ferguson NM, Dye C, Loman NJ, Lemey P, Rambaut A, Fraiji NA, Carvalho MDPSS, Pybus OG, Flaxman S, Bhatt S, Sabino EC. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021 May 21;372(6544):815-821. doi: 10.1126/science.abh2644. Epub 2021 Apr 14. PMID: 33853970; PMCID: PMC8139423.

- Fang, L., Karakiulakis, G., & Roth, M. (2020). Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(4), e21. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8)
- Fung, S. Y., Siu, K. L., Lin, H., Chan, C. P., Yeung, M. L., & Jin, D. Y. (2022). SARS-CoV-2 NSP13 helicase suppresses interferon signaling by perturbing JAK1 phosphorylation of STAT1. *Cell and Bioscience*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00770-1>
- Gandhi, S., Klein, J., Robertson, A. J., Peña-Hernández, M. A., Lin, M. J., Roychoudhury, P., Lu, P., Fournier, J., Ferguson, D., Mohamed Bakhsh, S. A. K., Catherine Muenker, M., Srivathsan, A., Wunder, E. A., Kerantzas, N., Wang, W., Lindenbach, B., Pyle, A., Wilen, C. B., Ogbuagu, O., ... Ko, A. I. (2022). De novo emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient: a case report. *Nature Communications*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29104-y>
- Gianfrancesco, M., Hyrich, K. L., Al-Adely, S., Al-Adely, S., Carmona, L., Danila, M. I., Gossec, L., Gossec, L., Izadi, Z., Jacobsohn, L., Katz, P., Lawson-Tovey, S., Lawson-Tovey, S., Mateus, E. F., Rush, S., Schmajuk, G., Simard, J., Strangfeld, A., Trupin, L., ... Robinson, P. C. (2020). Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: Data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(7), 859–866. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217871>
- Guimaraes, L. C., Costa, P. A. C., Scalzo Júnior, S. R. A., Ferreira, H. A. S., Braga, A. C. S., de Oliveira, L. C., Figueiredo, M. M., Shepherd, S., Hamilton, A., Queiroz-Junior, C. M., da Silva, W. N., da Silva, N. J. A., Rodrigues Alves, M. T., Santos, A. K., de Faria, K. K. S., Marim, F. M., Fukumasu, H., Birbrair, A., Teixeira-Carvalho, A., ... Guimaraes, P. P. G. (2024). Nanoparticle-based DNA vaccine protects against SARS-CoV-2 variants in female preclinical models. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44830-1>
- He, X., Lau, E. H. Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y.,

- Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., ... Leung, G. M. (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*, 26(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Hoang, T., Pino, M., Boddapati, A., ..., & Paiardini, M. (2020). Baricitinib treatment resolves lower-airway macrophage inflammation and neutrophil recruitment in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. *Cell*, 184(January), 460–475.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hogan, J. I., Duerr, R., Dimartino, D., Marier, C., Hochman, S. E., Mehta, S., Wang, G., & Heguy, A. (2023). Remdesivir Resistance in Transplant Recipients With Persistent Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 76(2), 342–345. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac769>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huet, T., Beaussier, H., Voisin, O., Jouveshomme, S., Dauriat, G., Lazareth, I., Sacco, E., Naccache, J. M., Bézie, Y., Laplanche, S., Le Berre, A., Le Pavec, J., Salmeron, S., Emmerich, J., Mourad, J. J., Chatellier, G., & Hayem, G. (2020). Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. *The Lancet Rheumatology*, 2(7), e393–e400. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30164-8](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30164-8)
- Hwang, Y. C., Lu, R. M., Su, S. C., Chiang, P. Y., Ko, S. H., Ke, F. Y., Liang, K. H., Hsieh, T. Y., & Wu, H. C. (2022). Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 1–50. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00784-w>

- Isabel, S., Fernando, A., Snia, Z., & Luis, E. (2005). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Annu Rev Virol*, 176(1), 265–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055218>.Continuous
- Jackman, J. A., Costa, V. V., Park, S., Real, A. L. C. V., Park, J. H., Cardozo, P. L., Ferhan, A. R., Olmo, I. G., Moreira, T. P., Bampirra, J. L., Queiroz, V. F., Queiroz-Junior, C. M., Foureaux, G., Souza, D. G., Ribeiro, F. M., Yoon, B. K., Wynendaele, E., De Spiegeleer, B., Teixeira, M. M., & Cho, N. J. (2018). Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nature Materials*, 17(11), 971–977. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0194-2>
- Jackman, J. A., Shi, P. Y., & Cho, N. J. (2018). Targeting the Achilles Heel of Mosquito-Borne Viruses for Antiviral Therapy. *ACS Infectious Diseases*, 5(1), 4–8. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00286>
- Jefferson, T., Spencer, E. A., Brassey, J., Onakpoya, I. J., Rosca, E. C., Plüddemann, A., Evans, D. H., Conly, J. M., & Heneghan, C. J. (2022). Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) from pre and asymptomatic infected individuals: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(January), 178–189.
- Kalil, A. C., Patterson, T. F., Mehta, A. K., Tomashek, K. M., Wolfe, C. R., Ghazaryan, V., Marconi, V. C., Ruiz-Palacios, G. M., Hsieh, L., Kline, S., Tapson, V., Iovine, N. M., Jain, M. K., Sweeney, D. A., El Sahly, H. M., Branche, A. R., Regalado Pineda, J., Lye, D. C., Sandkovsky, U., ... Beigel, J. H. (2021). Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(9), 795–807. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2031994>
- Kim, G. U., Kim, M. J., Ra, S. H., Lee, J., Bae, S., Jung, J., & Kim, S. H. (2020). Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. *Clinical Microbiology and Infection*, 26, 40–42. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.040>
- Kumar, A., Ishida, R., Strilets, T., Cole, J., Lopez-Orozco, J., Fayad, N., Felix-Lopez, A., Elaish, M., Evseev, D., Magor, K. E., Mahal, L. K., Nagata, L. P., Evans, D. H., & Hobman, T. C. (2021). SARS-CoV-2 Nonstructural Protein 1 Inhibits the

Interferon Response by Causing Depletion of Key Host Signaling Factors. *Journal of Virology*, 95(13), 1–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00266-21>

LeCher JC, Zandi K, Costa VV, Amblard F, Tao S, Patel D, Lee S, da Silva Santos FR, Goncalves MR, Queroz-Junior CM, Marim FM, Musall K, Goh SL, McBrayer T, Downs-Bowen J, De R, Azadi N, Kohler J, Teixeira MM, Schinazi RF. Discovery of a 2'-Fluoro,2'-Bromouridine Phosphoramidate Prodrug Exhibiting Anti-Yellow Fever Virus Activity in Culture and in Mice. *Microorganisms*. 2022 Oct 22;10(11):2098. doi: 10.3390/microorganisms10112098. PMID: 36363688; PMCID: PMC9694579.

Lei, J., Kusov, Y., & Hilgenfeld, R. (2018). Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Research*, 149(January), 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.001>

Li, J., & Fan, J. G. (2020). Characteristics and mechanism of liver injury in 2019 coronavirus disease. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 8(1), 13–17. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2020.00019>

Li, M. Y., Li, L., Zhang, Y., & Wang, X. S. (2020). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00662-x>

Li, R., Liu, J., & Zhang, H. (2021). The challenge of emerging SARS-CoV-2 mutants to vaccine development. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(2), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.001>

Lim, S. P., Noble, C. G., & Shi, P. Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research*, 119(April), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>

Lima, E. B. de S., Carvalho, A. F. S., Zaidan, I., Monteiro, A. H. A., Cardoso, C., Lara, E. S., Carneiro, F. S., Oliveira, L. C., Resende, F., Santos, F. R. da S., Souza-Costa, L. P., Chaves, I. de M., Queiroz-Junior, C. M., Russo, R. C., Santos, R. A. S., Tavares, L. P., Teixeira, M. M., Costa, V. V., & Sousa, L. P. (2024). Angiotensin-(1–7) decreases inflammation and lung damage caused by betacoronavirus infection in mice. *Inflammation Research*.

<https://doi.org/10.1007/s00011-024-01948-8>

- Littlefield, K. M., Watson, R. O., Schneider, J. M., Neff, C. P., Yamada, E., Zhang, M., Campbell, T. B., Falta, M. T., Jolley, S. E., Fontenot, A. P., & Palmer, B. E. (2022). SARS-CoV-2-specific T cells associate with inflammation and reduced lung function in pulmonary post-acute sequelae of SARS-CoV-2. *PLoS Pathogens*, *18*(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010359>
- Liu, Y., Liu, J., Johnson, B. A., Xia, H., Ku, Z., Schindewolf, C., Widen, S. G., An, Z., Weaver, S. C., Menachery, V. D., Xie, X., & Shi, P. Y. (2022). Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant. *Cell Reports*, *39*(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110829>
- Lu, S., Ye, Q., Singh, D., Cao, Y., Diedrich, J. K., Yates, J. R., Villa, E., Cleveland, D. W., & Corbett, K. D. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20768-y>
- Lucchiari, M. A., Pereira, C. A., Kuhn, L., & Lefkovits, I. (1992). The pattern of proteins synthesized in the liver is profoundly modified upon infection of susceptible mice with mouse hepatitis virus 3. *Res. Virol*, *143*(March), 231–240.
- Madabhavi, I., Sarkar, M., & Kadakol, N. (2020). Covid-19: A review. *Monaldi Archives for Chest Disease*, *90*(2), 248–258. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2020.1298>
- Mahase, E. (2021). Covid-19: Molnupiravir reduces risk of hospital admission or death by 50% in patients at risk, MSD reports. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *375*(October), n2422. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2422>
- Martinot, M., Jary, A., Fafi-Kremer, S., Leducq, V., Delagreverie, H., Garnier, M., Pacanowski, J., Mékinian, A., Pirenne, F., Tiberghien, P., Calvez, V., Humbrecht, C., Marcelin, A. G., & Lacombe, K. (2021). Emerging RNA-Dependent RNA Polymerase Mutation in a Remdesivir-Treated B-cell Immunodeficient Patient with Protracted Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, *73*(7), E1762–E1765. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1474>
- Meringer H, Mehandru S. Gastrointestinal post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Rev*

- Gastroenterol Hepatol.* 2022;19(6):345-346. doi:10.1038/s41575-022-00611-z
- MERK. (2021). *Merck-and-Ridgebacks-Investigational-Oral-Antiviral-Molnupiravir-Reduced-the-Risk-of-Hospitalization-or-Death-by-Approximately-50-Per-C1CSM.* 1–6.
- Moghaddam, E., Teoh, B. T., Sam, S. S., Lani, R., Hassandarvish, P., Chik, Z., Yueh, A., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Scientific Reports*, 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep05452>
- Monje, M., & Iwasaki, A. (2022). The neurobiology of long COVID. *Cell Press*, 110, 19–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.006> SUMMARY
- Montazersaheb, S., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Hejazi, M. S., Tarhriz, V., Farjami, A., Ghasemian Sorbeni, F., Farahzadi, R., & Ghasemnejad, T. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>
- Ngwe Tun, M. M., Toume, K., Luvai, E., Nwe, K. M., Mizukami, S., Hirayama, K., Komatsu, K., & Morita, K. (2022). The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro. *Journal of Natural Medicines*, 76(2), 402–409. <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01596-w>
- Nishiura, H., Linton, N. M., & Akhmetzhanov, A. R. (2020). Serial interval of novel coronavirus (COVID-19) infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 93, 284–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.060>
- Oliveira, V. L. S., Queiroz-junior, C. M., Hoorelbeke, D., Rocha, F., Chaves, I. D. M., Teixeira, M. M., Russo, R. de C., Proost, P., Costa, V. V., Strufy, S., & Amaral, F. A. (2024). The glycosaminoglycan-binding chemokine fragment CXCL9(74– 103) reduces inflammation and tissue damage in mouse models of coronavirus infection. *Frontiers in Immunology*, 9(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1378591>
- Oo, A., Rausalu, K., Merits, A., Higgs, S., Vanlandingham, D., Bakar, S. A., & Zandi, K. (2018). Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral Research*, 150(April 2017), 101–111.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.012>

Owen, D. R., Allerton, C. M. N., Anderson, A. S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., Boras, B., Cardin, R. D., Carlo, A., Coffman, K. J., Dantonio, A., Di, L., Eng, H., Ferre, R. A., Gajiwala, K. S., Gibson, S. A., Greasley, S. E., Hurst, B. L., Kadar, E. P., ... Zhu, Y. (2021). An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, 374(6575), 1586–1593. <https://doi.org/10.1126/science.abl4784>

Paneroni, M., Simonelli, C., Saleri, M., Bertacchini, L., Venturelli, M., Troosters, T., Ambrosino, N., & Vitacca, M. (2021). Muscle Strength and Physical Performance in Patients without Previous Disabilities Recovering from COVID-19 Pneumonia. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 100(2), 105–109. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001641>

Pimenta, J. C., Beltrami, V. A., Oliveira, B. D. S., Queiroz-Junior, C. M., Barsalini, J., Teixeira, D. C., Souza-Costa, L. P. de, Lima, A. L. D., Machado, C. A., Parreira, B. Z. S. G., Santos, F. R. da S., Costa, P. A. C., Lacerda, L. D. S. B., Gonçalves, M. R., Chaves, I. de M., Couto, M. G. G. Do, Costa, V. R. de M., Nóbrega, N. R. C., Silva, B. L., ... Costa, V. V. (2024). Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice. *BioRxiv*, 2024.01.10.575003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2024.01.10.575003>

Pimenta, J., Da Silva Oliveira, B., Lima, A. L. D., Machado, C. A., De Souza Barbosa Lacerda, L., Rossi, L., Queiroz-Junior, C. M., De Souza-Costa, L. P., Andrade, A. C. S. P., Gonçalves, M. R., Mota, B., Marim, F. M., Aguiar, R. S., Guimarães, P. P. G., Teixeira, A. L., Vieira, L. B., Guatimosim, C., Teixeira, M. M., De Miranda, A. S., & Costa, V. V. (2023). A suitable model to investigate acute neurological consequences of coronavirus infection. *Inflammation Research*, 72(10–11), 2073–2088. <https://doi.org/10.1007/s00011-023-01798-w>

Pollack B, von Saltza E, McCorkell L, et al. Female reproductive health impacts of Long COVID and associated illnesses including ME/CFS, POTS, and connective tissue disorders: a literature review. *Front Rehabil Sci*. 2023;4:1122673. Published 2023 Apr 28. doi:10.3389/fresc.2023.1122673

Puntmann, V. O., Carerj, M. L., Wieters, I., Fahim, M., Arendt, C., Hoffmann, J.,

- Shchendrygina, A., Escher, F., Vasa-Nicotera, M., Zeiher, A. M., Vehreschild, M., & Nagel, E. (2020). Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiology*, 5(11), 1265–1273. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557>
- Qiu, W., Chu, C., Mao, A., & Wu, J. (2018). The impacts on health, society, and economy of SARS and H7N9 Outbreaks in China: A Case Comparison Study. *Journal of Environmental and Public Health*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2710185>
- Rawlinson, S., Pryor, M., Wright, P., & Jans, D. (2006). Dengue Virus RNA Polymerase NS5: A Potential Therapeutic Target? *Current Drug Targets*, 7(12), 1623–1638. <https://doi.org/10.2174/138945006779025383>
- Roingard, P., Eymieux, S., Burlaud-Gaillard, J., Hourieux, C., Patient, R., & Blanchard, E. (2022). The double-membrane vesicle (DMV): a virus-induced organelle dedicated to the replication of SARS-CoV-2 and other positive-sense single-stranded RNA viruses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(8), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04469-x>
- Rössler, A., Riepler, L., Bante, D., Laer, D. von, & Kimpel, J. (2021). Correspondence SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization in Serum from Vaccinated and Convalescent Persons. *The New England Journal of Medicine Correspondence*, 1–3.
- Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, Leibundgut M, Thiel V, Mühlemann O, Ban N. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat Struct Mol Biol*. 2020 Oct;27(10):959-966. doi: 10.1038/s41594-020-0511-8. Epub 2020 Sep 9. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol*. 2020 Nov;27(11):1094. doi: 10.1038/s41594-020-00533-x. PMID: 32908316.
- Scott, B. M., Lacasse, V., Blom, D. G., Tonner, P. D., & Blom, N. S. (2022). Predicted coronavirus Nsp5 protease cleavage sites in the human proteome. *BMC Genomic Data*, 23(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12863-022-01044-y>
- Sevrioukova, I. F., & Poulos, T. L. (2010). Structure and mechanism of the complex between cytochrome P4503A4 and ritonavir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18422–18427.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1010693107>

Shankar-Hari M, Vale CL, Godolphin PJ, Fisher D, Higgins JPT, Spiga F, Savovic J, Tierney J, Baron G, Benbenishty JS, Berry LR, Broman N, Cavalcanti AB, Colman R, De Buyser SL, Derde LPG, Domingo P, Omar SF, Fernandez-Cruz A, Feuth T, Garcia F, Garcia-Vicuna R, Gonzalez-Alvaro I, Gordon AC, Haynes R, Hermine O, Horby PW, Horick NK, Kumar K, Lambrecht BN, Landray MJ, Leal L, Lederer DJ, Lorenzi E, Mariette X, Merchante N, Misnan NA, Mohan SV, Nivens MC, Oksi J, Perez-Molina JA, Pizov R, Porcher R, Postma S, Rajasuriar R, Ramanan AV, Ravaud P, Reid PD, Rutgers A, Sancho-Lopez A, Seto TB, Sivapalasingam S, Soin AS, Staplin N, Stone JH, Strohbehn GW, Sundén-Cullberg J, Torre-Cisneros J, Tsai LW, van Hoogstraten H, van Meerten T, Veiga VC, Westerweel PE, Murthy S, Diaz JV, Marshall JC, Sterne JAC. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 2021 Aug 10;326(6):499-518. doi: 10.1001/jama.2021.11330. PMID: 34228774; PMCID: PMC8261689.

Song, J., Zhang, L., Xu, Y., Yang, D., Yang, S., Zhang, W., Wang, J., Tian, S., Yang, S., Yuan, T., Liu, A., Lv, Q., Li, F., Liu, H., Hou, B., Peng, X., Lu, Y., & Du, G. (2021). The comprehensive study on the therapeutic effects of baicalein for the treatment of COVID-19 in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114302>

Steiner, S., Kratzel, A., Barut, G. T., Lang, R. M., Aguiar Moreira, E., Thomann, L., Kelly, J. N., & Thiel, V. (2024). SARS-CoV-2 biology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 22(4), 206–225. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-01003-z>

Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>

The Recovery Collaborative Group. (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 384(8), 693–704. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2021436>

- Toots, M., Yoon, J. J., Hart, M., Natchus, M. G., Painter, G. R., & Plemper, R. K. (2020). Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model. *Translational Research*, 218, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.12.002>
- Truffaut, L., Demey, L., Bruyneel, A. V., Roman, A., Alard, S., De Vos, N., & Bruyneel, M. (2021). Post-discharge critical COVID-19 lung function related to severity of radiologic lung involvement at admission. *Respiratory Research*, 22(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01625-y>
- Urakova, N., Kuznetsova, V., Crossman, D. K., Sokratian, A., Guthrie, D. B., Kolykhalov, A. A., Lockwood, M. A., Natchus, M. G., Crowley, M. R., Painter, G. R., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2018). β -d-N⁴-Hydroxycytidine Is a Potent Anti-alphavirus Compound That Induces a High Level of Mutations in the Viral Genome. *Journal of Virology*, 92(3), 1–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01965-17>.
- Viana, R., Moyo, S., Amoako, D. G., Tegally, H., Scheepers, C., Althaus, C. L., Anyaneji, U. J., Bester, P. A., Boni, M. F., Chand, M., Choga, W. T., Colquhoun, R., Davids, M., Deforche, K., Doolabh, D., du Plessis, L., Engelbrecht, S., Everatt, J., Giandhari, J., ... de Oliveira, T. (2022). Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*, 603(7902), 679–686. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>
- Vora, S. M., Fontana, P., Mao, T., Leger, V., Zhang, Y., & Fu, T. (2022). Targeting stem-loop 1 of the SARS-CoV-2 5' UTR to suppress viral translation and Nsp1 evasion. *PNAS*, 119(9), 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117198119/-/DCSupplemental>. Published
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veerler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in


- Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(11), 1061–1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, P., Nair, M. S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Chang, J. Y., Yin, M. T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C. A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., & Ho, D. D. (2021). Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 593(7857), 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Wang, Y., Zhang, D., Du, G., Du, R., Zhao, J., Jin, Y., Fu, S., Gao, L., Cheng, Z., Lu, Q., Hu, Y., Luo, G., Wang, K., Lu, Y., Li, H., Wang, S., Ruan, S., Yang, C., Mei, C., ... Summary. (2020). Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*, 395(January), 19–21.
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 635–664. <https://doi.org/10.1128/membr.69.4.635-664.2005>
- Willett, B. J., Grove, J., MacLean, O. A., Wilkie, C., De Lorenzo, G., Furnon, W., Cantoni, D., Scott, S., Logan, N., Ashraf, S., Manali, M., Szemiel, A., Cowton, V., Vink, E., Harvey, W. T., Davis, C., Asamaphan, P., Smollett, K., Tong, L., ... Thomson, E. C. (2022). SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway. *Nature Microbiology*, 7(8), 1161–1179. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01143-7>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host and Microbe*, 27(3), 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
- Wu, Z., & McGoogan, J. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019(COVID-19) outbreak in China. *Jama*, 2019, 10.1001/jama.2020.2648. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

- Xie, Y., Xu, E., Bowe, B., & Al-Aly, Z. (2022). Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nature Medicine*, 28(3), 583–590. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01689-3>
- Xin Zhao, P. D., Rong Zhang, B. S., Shitong Qiao, B. S. A., Xiao Wang, B. S., Weibing Zhang, M. S. A., Wenjing Ruan, B. S., Lianpan Dai, P. D., & George F. Gao, D. P. (2022). Omicron SARS-CoV-2 Neutralization from Inactivated and ZF2001 Vaccines. *New England Journal of Medicine*, 387(3), 275–277. <https://doi.org/DOI: 10.1056/NEJMc2206900>
- Xu, G., Dou, J., Zhang, L., Guo, Q., & Zhou, C. (2010). Inhibitory effects of baicalein on the influenza virus in vivo is determined by baicalin in the serum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(2), 238–243. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.238>
- Yang, X., Yu, Y., Xu, J., Shu, H., Xia, J., Liu, H., Wu, Y., Zhang, L., Yu, Z., Fang, M., Yu, T., Wang, Y., Pan, S., Zou, X., Yuan, S., & Shang, Y. (2020). Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(5), 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
- Yang, Y., Hussain, S., Wang, H., Ke, M., & Guo, D. (2009). Translational control of the subgenomic RNAs of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virus Genes*, 39(1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0357-y>
- Yang, Z., Du, J., Chen, G., Zhao, J., Yang, X., Su, L., Cheng, G., & Tang, H. (2014). Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. *Virologica Sinica*, 29(6), 393–402. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3530-y>
- Ye, Z., Yuan, S., Chan, J. F., Jinxia, A., & Yu, C. (2021). *Beneficial effect of combinational methylprednisolone and remdesivir in hamster model of SARS-CoV-2 infection*. 10.
- Zandi, K., Bassit, L., Amblard, F., Cox, B. D., Hassandarvish, P., Moghaddam, E., Yueh, A., Rodrigues, G. O. L., Passos, I., Costa, V. V., AbuBakar, S., Zhou, L., Kohler, J., Teixeira, M. M., & Schinazi, R. F. (2019). Nucleoside analogs with

- selective antiviral activity against dengue fever and Japanese encephalitis viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AAC.00397-19>
- Zandi, K., Musall, K., Oo, A., Cao, D., Liang, B., Hassandarvish, P., Lan, S., Slack, R. L., Kirby, K. A., Bassit, L., Amblard, F., Kim, B., Abubakar, S., Sarafianos, S. G., & Schinazi, R. F. (2021). Baicalein and baicalin inhibit sars-cov-2 rna-dependent-rna polymerase. *Microorganisms*, 9(5), 1–10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050893>
- Zhao, Y. miao, Shang, Y. min, Song, W. bin, Li, Q. quan, Xie, H., Xu, Q. fu, Jia, J. li, Li, L. ming, Mao, H. li, Zhou, X. man, Luo, H., Gao, Y. feng, & Xu, A. guo. (2020). Follow-up study of the pulmonary function and related physiological characteristics of COVID-19 survivors three months after recovery. *EClinicalMedicine*, 25, 100463. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100463>
- Zheng, C., Shao, W., Chen, X., Zhang, B., Wang, G., & Zhang, W. (2021). Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 114 (2022)(January), 252–260.
- Zhou, M; Zhang, M; Qu, J. (2020). Coronavirus disease 2019: A clinical update. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(8), 4585–4596. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_21045
- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zmurko, J., Marques, R. E., Schols, D., Verbeken, E., Kaptein, S. J. F., & Neyts, J. (2016). The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004695>

Anexo 1. CEUA aprovado

Anexo referente ao CEUA aprovado para experimentação em animais dentro deste presente trabalho.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 338/2023
Título do projeto: AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS ANTIVIRAIS EM MODELO MURINO DE INFECÇÃO POR CORONAVIRUS
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Vivian Vasconcelos Costa
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 05/02/2024. Validade: 05/02/2024 à 04/02/2029.

Belo Horizonte, 05/02/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 250/2020

Título do projeto: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CANDIDATOS ANTIVIRAIS EM MODELO MURINO DE SINDROME RESPIRATORIA AGUDA GRAVE (SARS) INDUZIDO POR CORONAVIRUS

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Vivian Vasconcelos Costa

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado com Recomendação na reunião on-line do dia 14/12/2020. Validade: 14/12/2020 à 13/12/2025
RECOMENDAÇÃO: A CEUA recomenda que a pesquisadora dê o mesmo tratamento e destinação final descrito para as carcaças aos dejetos e demais resíduos oriundos da pesquisa, já que resíduos incluem maravalha, seringas e outros materiais utilizados na pesquisa e não apenas as carcaças como descrito no protocolo.
Belo Horizonte, 14/12/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2. Artigo finalizado submetido.**Broad-Spectrum Antiviral Efficacy of 7-Deaza-7-Fluoro-2'-C-Methyladenosine Against Multiple Coronaviruses in *In Vitro* and in Animal Models.**

Ian de Meira Chaves¹, Filipe Resende Oliveira de Souza¹, Celso Martins Queiroz-Junior¹, Leonardo Camilo de Oliveira², Ana Cláudia Dos Santos Pereira Andrade³, Victor Rodrigues de Melo Costa⁴, Danielle Cunha Teixeira⁴, Felipe Rocha da Silva Santos², Talita Cristina Martins da Fonseca¹, Larisse de Souza Barbosa Lacerda¹, Rafaela das Dores Pereira², Jordane Clarisse Pimenta Gaggino¹, Franck Amblard⁵, Raymond F. Schinazi⁵, Mauro Martins Teixeira^{2*} Vivian Vasconcelos Costa^{1*}.

¹Departamento de morfologia - Instituto de Ciências Biológicas – ICB UFMG;

²Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB UFMG, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec - Université Laval, Québec Canada³. Departamento de Microbiologia - ICB UFMG⁴, Center for ViroScience and Cure, Laboratory of Biochemical Pharmacology, Department of Pediatrics, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, USA⁵.

*Both are corresponding authors: mmtextufmg@gmail.com and vivianvcosta@gmail.com

Abstract

The Coronaviridae family has been linked to several significant epidemics over the past two decades, including SARS-CoV, MERS-CoV, and more recently SARS-CoV-2. The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has resulted in over seven million deaths globally and has led to prolonged symptoms, sequelae, and substantial socioeconomic impacts. The limited availability of effective antivirals and the ability of

viruses to mutate and evade immune responses highlight the urgent need for novel antiviral agents. This study investigates the potential of the nucleoside analogue DFMA as an antiviral agent against various Coronaviridae members, including SARS-CoV-2 and two murine hepatitis viruses (MHV-3 and MHV-A59). In vitro assays revealed DFMA to be effective against both MHV-3 and MHV-A59, as well as SARS-CoV-2, with a Selectivity Index (SI) of 6.2. Furthermore, in vivo experiments demonstrated that DFMA significantly reduced viral loads in all three infection models and decreased levels of inflammatory mediators, including CXCL1, CCL2, and IL-6, in the lungs of infected mice. These findings suggest that DFMA holds promise as an antiviral agent not only against SARS-CoV-2 but also against other coronaviruses that may emerge.

1. Introduction

COVID-19 has caused over seven million deaths globally and has overwhelmed healthcare systems. Additionally, the virus can lead to prolonged symptoms, known as Long COVID, which affects more than 100 million people worldwide (Bull-Otterson et al., 2022; Davis et al., 2023; Littlefield et al., 2022; Monje & Iwasaki, 2022; Xie et al., 2022) and is associated with significant socioeconomic impacts (Nicola et al., 2020). Severe COVID-19 is associated with high viral titers commonly accompanied by an exacerbated host inflammatory response, characterized by massive production of inflammatory mediators denominated as cytokine storm (Huang et al., 2020; Montazersaheb et al., 2022).

Currently, there are several vaccines approved for emergency use and various vaccines are under development around the world. Meanwhile, a factor of concern was the speed at which new variants of SARS-CoV-2 emerged. Several variants have been described since the emergence of COVID-19, and mutations presented by new variants are constantly being associated with greater transmissibility and enhanced immune evasion in relation to vaccines in use and previous infections (Cromer et al., 2022; R. Li et al., 2021; Rössler et al., 2021; Viana et al., 2022; P. Wang et al., 2021). For other human coronaviruses, a positive correlation between the severity of the disease and high viral titers in these individuals has already been demonstrated

(Channappanavar & Perlman 2017) and was recently reported in COVID-19 patients (Bauer et al., 2023).

Given that the Coronaviridae family has repeatedly demonstrated its ability to cause significant public health crises, and with its viruses exhibiting high mutation rates, there is a critical need for effective treatments. Due to the short therapeutic window of the disease, it is imperative to identify new molecules capable of reducing viral titers during the acute phase, thereby improving both the immediate and long-term prognosis of patients.

Only three antiviral medications have already been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of COVID-19. They are: i) Nirmatrelvir as an 3CL protease inhibitor (Owen et al., 2021). ii) Remdesivir (Veklury) and iii) Molnupiravir (Lagevrio), both nucleoside analog (Brown et al., 2019; Wang et al., 2020; Mahase, 2021; MERK, 2021; Toots et al., 2020; Urakova et al., 2018). Considering the scarcity of antiviral molecules, the search for alternative therapeutic options aimed at containing and/or alleviating cases of COVID-19, such as the use of antiviral drugs or monoclonal antibody therapies (Hwang et al., 2022) becomes necessary.

As a screening platform to assist in testing potential drugs, the MHV (Mouse Hepatitis Virus) has been utilized. MHV (Murine Hepatitis Virus), like SARS-CoV-2, is a betacoronavirus; however, it is a natural pathogen in mice capable of causing hepatitis and potentially leading to lethality in these mice (Lucchiari et al., 1992). Working with the MHV requires biosafety level 2 laboratories and animal facilities, unlike the SARS-CoV-2, which necessitates a biosafety level 3 laboratory. Our group has demonstrated the usability of an infection model with the MHV-3 capable of causing severe pulmonary damage when inoculated intranasally. This model has been employed to study alternative methods of attenuation of the disease and to understand parameters related to viral replication and coronavirus acute pathology (Andrade et al., 2021; Campolina-Silva et al., 2023). Additionally, MHV-A59 has been recently employed to study the acute lung infection as well as the neuropsychiatric sequelae induced by the infection (J. C. Pimenta et al., 2024).

In this study, we propose to test the potential antiviral activity of 7-deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine (DFMA) against different coronaviruses, including MHV and SARS-CoV-2. DFMA is a nucleoside analog that has previously demonstrated potent antiviral activity and a reduction in neuroinflammation induced by ZKV infection *in vivo* (Del Sarto et al., 2020a), as well as activity against DENV and WNV (Zandi et al., 2019) and YFV (unpublished data). To this end, we evaluated its efficacy both *in vitro* and *in vivo* using different models of coronavirus infection, including MHV and SARS-CoV-2. Our results indicate that DFMA is a potent antiviral capable of exerting activity against three members of the Coronaviridae family, including SARS-CoV-2. Therefore, we believe this preclinical study could serve as an initial stage in the development of this promising nucleoside analog.

2. Materials and Methods

2.1 Viruses and Antiviral agent (DFMA)

The murine hepatitis virus strain MHV-3 (GenBank accession no. MW620427.1) and MHV-A59 (ATCC VR-764TM) available on <https://www.atcc.org/products/all/VR-764.aspx>) was acquired and propagated in L929 cells (ATCC, CCL1) for the generation of viral stocks. SARS-CoV-2 (Wuhan Hu-1 sample SP02BRA GenBank access number MT350282) was propagated in Vero CCL81 cells and was used in *in vitro* experiments conducted under BSL3. Gamma variant (also known as P.1; #EPI_ISL_1060902, hCoV-19/Brazil/AM-L70-71-CD1739/2020) were isolated on Vero E6 cells from nasopharyngeal swabs of confirmed cases and used in *in vivo* experiments. DFMA was synthesized in the Schinazi lab at Emory University as previously reported (Zandi et al, 2019) and was at least 98% pure as determined by NMR and LC-MS-MS.

2.2 *In vitro* experimentation

L929 cells were cultured using DMEM medium, and Vero cells (BCRJ 0245) were cultured using RPMI medium. In both cases, the media were supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics for propagation and 2% fetal bovine serum for plating and during the assays.

CALU-3 lung epithelial cells (BCRJ 0264 <http://bcry.org.br/celula/0264>) were cultured in DMEM medium supplemented with 20% fetal bovine serum. (FBS), 1% of non-essential amino acids, 2 mM de L-glutamine, 1 mM of sodium pyruvate, as well as antibiotics. All cells were maintained in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

In both MHV-3 and SARS-CoV-2 cases, DFMA was tested in a 96-well plate being inoculated together with the virus at an MOI of 0.01 at different concentrations. In-vitro tests for the MHV were conducted using L929 cells, which were plated at 5 x 10⁴ cells per well and incubated for 24 hr at 37°C at 5% CO₂. Medium was removed, and MHV-3 or MHV-A59 was added at MOI 0.01 along with different concentrations of DFMA. After 16 hr, MTT and LDH assays were performed, and the supernatant was collected for viral load analysis.

In vitro SARS-CoV-2 experiments were conducted in partnership with UFMG BSL3 and BSL4 of LANAGRO Laboratory, part of the Federal Network of Agricultural Defense Laboratories. Calu-3 were plated at 2,5 x 10⁴ cells per well and incubated under the same parameters described above. After 48 hr, cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI 0.01 along with different concentrations of DFMA. After an additional 24 hr, DFMA was re-added at the same concentrations. Analyses were conducted 48 hr post-viral inoculation. Toxicity tests of DFMA on Calu-3 cells were performed in a BSL-2 environment, where cells were plated and incubated at the same conditions described for 48 hr without infection. DFMA was added at different concentrations and re-added after more 24 hr. After 48 hr from the initial addition of DFMA, MTT assay was conducted. The supernatant was collected and stored at -80°C for viral titer assessment.

4.2.1 Plaque assay

Vero or L929 monolayers were seeded into 24-well plates and incubated for 24 hr at 37 °C with 5% CO₂. Monolayers were then exposed to different dilutions of supernatants of *in vitro* tests or diluted organs samples for 1 hr at 37 °C. Fresh semi-solid medium containing 1.2% carboxymethylcellulose (CMC) was then added, and the cultures were maintained at 37 °C for 72 hr. After incubation, cells were fixed with a 10% formaldehyde solution for 60 min at room temperature and subsequently stained with 0.5% crystal violet for 30 min. Titer was expressed as pfu/mL.

4.3 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

The MTT method was employed to assess cell viability, using a concentration of 0.5 mg/mL diluted in DMEM medium. The solution was applied to the cells and then incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 2 hr. After incubation, the content was removed and the salt formed by the MTT reaction was dissolved by adding 100 µL of DMSO. Absorbance was measured using a plate spectrophotometer at OD of 540 nm.

4.4 LDH (lactate dehydrogenase)

For the LDH assay, a kinetic kit from Bioclin (catalog no. K014, Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) was used, following the methodology recommended by the manufacturer with modifications. Test was conducted in 96-well plates, with 4 µL of cellular supernatant added. Subsequently, 200 µL of the kit's working solution was added, and the absorbance was measured immediately at 340 nm. Three readings were taken with a one-minute interval between readings to calculate substrate consumption per minute. The values were expressed in absorbance (Δ/min).

$$\Delta/\text{min} = [(\text{Abs. 1}^{\text{st}} \text{ read} - \text{Abs. 2}^{\text{nd}} \text{ read}) + (\text{Abs. 3}^{\text{rd}} \text{ read} - \text{Abs. 4}^{\text{th}} \text{ read})]$$

4.5 Ethics, *In vivo* infections and DFMA treatment

C57BL/6 mice aged 6 to 8 weeks, supplied by the Central Animal Facility of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) were supplied by Bioterio central – UFMG and used for the experiments involving MHV. K18-Human ACE2 Transgenic mice originally obtained from The Jackson laboratories (<https://www.jax.org/strain/034860>), created and maintained at Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG were used for SARS-CoV-2 experiments. In both instances, for intranasal infection, mice were anesthetized subcutaneously with a solution containing 80 mg/kg of ketamine and 15 mg/kg of xylazine. Mice infected with MHV or SARS-CoV-2 received 30µL of the viral inoculum containing 1 x 10³ PFU for MHV-3 as described by Andrade et al (2021), 1 x 10⁴ PFU for MHV-A59 (J. C. Pimenta et al., 2024) and 2 x 10⁵ for SARS-CoV-2 (Guimaraes et al., 2024). This study

was previously submitted to the Ethics Committee on Animal Experimentation at UFMG and approved under protocols 338/2023 and 140/2023 (CEUA-UFMG) and 191/2021 (CEUA-UFMG).

For the evaluation of the effect of DFMA during viral infection, mice were treated BID with 10 mg/kg of DFMA, starting the treatment two days before infection (Del Sarto et al., 2020a). Mice were randomly divided into groups, weighed, and monitored daily. After infection, mice that reached 80% of their initial body weight were euthanized in accordance with the rules of the Ethics Committee for Animal Experimentation. (CEUA-UFMG). For analysis, mice were euthanized on the peak of viral replication or/ lung damage, represented as day 3 after MHV-3 infection (Andrade et al., 2021), second day after MHV-A59 infection, and fifth day after SARS-CoV-2 infection. Analysis, included inflammatory scoring in the lungs, quantification of chemokines and cytokines in the plasma and lungs of the animals, viral load quantification by qPCR in the lungs, immunohistochemistry for visualization of Spike protein of SARS-CoV-2 and hematological analyses.

4.8 Viral quantification by qPCR

The viral RNA from the tissue was extracted using the viral RNA extraction kit. QIAamp® Viral RNA following the manufacturer's instructions, with adaptations, where the tissues were removed from RNAlater and homogenized in the lysis buffer of the kit. Samples were eluted and quantified on a spectrophotometer (NanoDrop™, Thermo Scientific). cDNA production was performed using 500 ng of RNA, using the kit iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD), following the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was diluted 10x for use in the qPCR reaction. In the reaction, Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™) was used and specific primers for MHV at concentration of 5 nM: Forward 5'-CAGATCCTTGATGATGGCGTAGT-3'; Reverse 5'-AGAGTGTCTATCCCGACTTTCTC-3'. Standard curve was obtained through the RNA extraction from a known PFU quantity of MHV and the result were expressed in arbitrary units/500ng of cDNA. qPCR for detecting SARS-CoV-2 was performed using 2019-nCoV RUO kit (IDT) for N1 region and reaction ran in CFX Opus 96 (BIO-RAD). Standard was produced from a known number of copies by 2019-nCoV_N Positive Control (IDT). The results were expressed by number of copies/ 50ng of RNA.

4.9 Hematological analyses

Blood collection was performed after euthanasia and assessment of parameters on the veterinary hematological analyzer for the experiments with MHV-3 and MHV-A59 in BSL-2 laboratory (MEK 6550J/K – Celltak). Blood was then centrifuged at 4°C at 5,000 RPM for 10 min, and the supernatant was collected and frozen at -80°C for subsequent analysis.

4.10 Histopathological analyses

Histopathological analysis was performed in the organs of mice which were collected and fixed in 10% buffered formalin solution after euthanasia. Samples were then embedded in paraffin, sectioned using a microtome, mounted on histological slides, processed and stained with hematoxylin and eosin. Analyses were carried out using a system previously described by Andrade et al. (2021), performed by a blinded pathologist.

4.11 Immunohistochemistry (IHC)

Histological lung sections from infected animals treated or untreated with DFMA were processed for spike protein staining using immunohistochemistry. The process involved a streptavidin-biotin protocol. Endogenous peroxidase was blocked using 0.3% hydrogen peroxide, and antigen retrieval was performed with 1.266 mM EDTA buffer at pH 8. Sections were incubated with primary SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody (Sino biological - 40591-T62) at a 1:500 dilution. Subsequently, sections were incubated with the anti-rabbit secondary ABC kit (Vector laboratories) and developed with DAB chromogen counterstained with hematoxylin. Negative reaction controls were performed on sections without primary antibodies added.

4.12 ELISA

Quantification of the chemokines CXCL1, CCL2, and the cytokine IL-6 were performed using the mouse DuoSet enzyme-limited immunosorbent assay (ELISA) system (R&D Systems), as described by Andrade et al (2021).

4.13 Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) or just as mean for parametric tests, and for non-parametric tests the median with interquartile range was presented. The normality test was applied using the Shapiro-Wilk test. Means were compared using analysis of variance by one-way ANOVA, followed by Tukey test for normal distribution and Kruskal-Wallis plus Dunn's test for sampling without normal distribution and for analyses involving only two groups, the T-test was employed. Results were considered significant when the value of $p < 0.05$. For the construction of the graphs, GraphPad PRISM 9 software was used. The exclusion of outlier values was performed through the GraphPad PRISM software platform itself.

3. Results

DFMA exerted antiviral activity against MHV-3 and MHV-A59 *in vitro*.

To assess the potential DFMA's antiviral capability against coronaviruses, an *in vitro* evaluation was first conducted (**Fig. 1A**), testing different concentrations within a pre-analyzed spectrum (Del Sarto et al., 2020). First, MHV-3 was used, and *in vitro* tests indicated that MHV-3 induced the formation of numerous syncytia in L929 cells at an MOI of 0.01 (**Fig. 1B**). DFMA at 30 μ M partially restored the original morphology of L929 cells, as shown in representative images (**Fig. 1B**). DFMA exhibited notable antiviral activity, reducing viral titers in the supernatant of infected cells, with effects observable from 10 μ M (**C**). DFMA achieved a 1,000-fold reduction in viral titers at 30 μ M (**Fig. 1C**). Furthermore, cell death of the L929 monolayer was quantified using the LDH assay. This assay demonstrated that MHV-3 induced a significant increase in cellular death. DFMA, starting from 10 μ M, partially reversed cellular death. However, at a concentration of 30 μ M, DFMA completely restored LDH levels comparable to uninfected cells (**Fig. 1D**).

Further the *in vitro* antiviral potential of DFMA against the MHV-A59 was assessed. MHV-A59 induced the formation of numerous syncytia in the L929 cell monolayer after 16 hr. DFMA at 30 μ M completely restored cell morphology (**Fig. 1E**). The titration of the cell supernatant demonstrated that DFMA also showed a significantly reduced viral titer even at 10 μ M (**Fig. 1F**). At higher concentrations, DFMA achieved a reduction of

over 10 times in the recovered viral titers from the supernatant at 30 μ M when compared to non-treated cells (**Fig. 1F**). Cell death analysis demonstrated that, like MHV-3, MHV-A59 infection resulted in a significant increase in cell death (**Fig. 1G**). DFMA was able to prevent those parameters of cell death almost completely at concentrations starting from 30 μ M. (**Fig. 1G**).

Treatment with DFMA played an antiviral role in vivo and improves several disease parameters in a severe COVID model using MHV-3.

MHV-3 has already been demonstrated as a pathogen capable of causing severe disease in mice, considered a good model for severe acute COVID-like illness (Andrade et al., 2021). Therefore, given that intranasal infection with the MHV-3 serves as a model for COVID, capable of mimicking COVID, the antiviral capacity of DFMA within the context of MHV-3 infection were evaluated in animal models (**Fig. 2A**).

First, viral load in the lungs of mice was assessed through qPCR, showing that mice infected with MHV-3 had the presence of viral RNA in their lungs at third day after infection. Interestingly, virus quantification was significantly reduced by approximately 90% in the lungs of mice treated with DFMA (**Fig. 2B**).

Histological analyses showed a higher inflammatory score in the lungs of mice infected with MHV-3, primarily characterized by a cellular infiltrate of polymorphonuclear cells (**Fig. 2C**). The increase in inflammatory score induced by MHV-3 infection was not totally reduced with treatment using DFMA (**Fig. 2D**).

Recognizing the importance of the cytokine storm within the context of COVID-19, quantification of chemokines and cytokines present in the lung tissue was performed and the analyses demonstrated that MHV-3 infection induced an increase in the chemokines CXCL1 (**Fig. 2E**) and CCL2 (**Fig. 2F**), as well as an increased levels in the cytokine IL-6 (**Fig. 2G**). Treatment with DFMA not only was able to reduce the viral load, but this reduction also led to reverse the increased levels of mediators CXCL1 (**Fig. 2E**) and IL-6 (**Fig. 2G**) when compared to a non-treated group.

Besides the lungs, MHV-3 was also able to systemically increase the levels of the mediators CXCL1 (**Fig. 2H**), CCL2 (**Fig. 2I**), and IL-6 (**Fig. 2J**) in the serum of infected animals. Interestingly, treatment with DFMA was able to reverse this increase and

restore the baseline levels of the chemokine CXCL1 (**Fig. 2H**), although it did not show a significant difference for the mediators CCL2 (**Fig. 2I**) and IL-6 (**Fig. 2J**). Systemically, granulocyte/lymphocyte ratio was evaluated. At the peak of the COVID pandemic, the neutrophil-lymphocyte ratio was considered an important marker for predicting patient prognosis (Chan & Rout, 2020; X. Li et al., 2020). In our model, mice infected intranasally by MHV-3 and euthanized three days after showed increased levels of granulocyte/lymphocyte ratio, and DFMA was not able to reverse this parameter ($p = 0.197$) (**Fig. 2K**). Another group of mice were not euthanized by the third day and were monitored for clinical score on the fifth day post-infection. Results showed a significant increase in the clinical score of mice infected with MHV-3, but treatment with DFMA was not able to improve the clinical condition of these mice (**Fig. 2L**).

DFMA exhibited antiviral activity against MHV-A59 and improved inflammatory parameters.

Considering that COVID-19 complications have not only presented acutely, the antiviral capacity of DFMA was also analyzed within a model of mild COVID using mHV-A59 (**Fig. 3A**). *In vivo* data revealed that MHV-A59 infection was associated with the recovery of a high viral RNA copies in the lungs of mice, measured by RT-qPCR, but treatment with DFMA also leads to decrease the quantification of viral RNA copies (**Fig. 3B**). Representative images were also taken of lung histological sections showing a large inflammatory infiltrate in the lung tissues of untreated infected mice, which was not observed in mice treated with DFMA (**Fig. 3C**). Infection leads to increased inflammatory scores in the lungs of untreated mice, although it did not reach statistical significance when compared to the DFMA-treated group (**Fig. 3D**).

In addition to assessing viral load and confirming that DFMA indeed exerted antiviral activity within the context of MHV-A59 infection, its ability to improve inflammatory parameters were also analyzed. MHV-A59 infection was also associated with an increase in the chemokine CXCL1 in both the lungs of infected mice treated and untreated with DFMA (**Fig. 2E**). Upon evaluating the chemokine CCL2, a substantial elevation induced by MHV- infection was measured in untreated mice, however, following DFMA treatment, mice exhibited diminished levels of this cytokine (**Fig. 2F**). No difference between groups were detected when IL-6 was measured (**Fig. 2G**).

MHV-A59 infection led to an increase in Granulocytes/Lymphocytes ratio (**Fig. 2H**). Interestingly, in this model, treatment with DFMA was able to decrease the ratio when compared to untreated mice (**Fig. 2H**).

DFMA exerted antiviral effects against SARS-CoV-2 in *in vitro* and *in vivo*

To assess the potential antiviral effect of DFMA directly against the SARS-CoV-2 *in vitro*, immortalized lung epithelial cells (Calu-3) were infected at MOI = 0.01 and treated with different DFMA concentrations (**Fig. 4A**). DFMA at 30 μ M induced a reduction of approximately 15-fold in the recovered viral titer compared to the supernatant from untreated cells (**Fig. 4B**) with an EC₅₀ value of 8.2 (**Fig. 4C**). To evaluate DFMA cytotoxicity in Calu-3 cells, cell monolayer was exposed to different DFMA concentrations, resulting in a CC₅₀ of 51.0 (**Fig. 4C**) and an SI of 6.2, being considered a potent and promising antiviral.

An *in vivo* experiment was conducted using K18-Human ACE2 mice infected with SARS-CoV-2 and euthanized on the third day post-infection (**Fig. 5A**). Viral load was evaluated through quantitation of viral RNA copies by RT-qPCR. The infection led to a high recovery of viral RNA copies, and interestingly, DFMA was again able to decrease this number of viral RNA copies recovered in lungs measured by qPCR (**Fig. 5B**) and demonstrated representatively with the staining of SARS-CoV-2 Spike protein (**Fig. 5C**) validating all previous results and effectively presenting DFMA as a potential antiviral for coronaviruses.

Like in MHV infection, in addition to the viral load results, lung histological sections reveal a substantial inflammatory infiltrate in the lung tissues of untreated infected mice, which was absent in mice treated with DFMA (**Fig. 5D**). Infected mice showed a significant increase in lung inflammatory scores but the treatment with DFMA did not show statistical significance for this parameter (**Fig. 5E**).

Additionally, the quantification of inflammatory mediators in the lung tissues of mice infected with SARS-CoV-2 was also assessed and did not observe differences in CXCL1 levels between groups (**Fig 5F**). On the other hand, evaluating the chemokine CCL2, a significant increase in the lungs of SARS-CoV-2 infected animals was evaluated. However, treatment with DFMA was able to significantly reduce the CCL2

levels, returning them to baseline levels (**Fig. 5G**). No differences were observed between the groups for the cytokine IL-6 (**Fig. 5H**).

4. Discussion

Coronaviridae family includes various viruses capable of infecting humans, birds, rodents, and other animal species (Su et al., 2016). Some coronaviruses are globally distributed and capable of causing mild respiratory infections in humans, such as 229E, OC43, NL63, and HKU1 (Su et al., 2016). In addition to mild infections, coronaviruses have also been responsible for significant epidemics leading to serious respiratory complications over the past 20 years, such as severe acute respiratory syndrome (SARS) caused by SARS-CoV (WHO, 2003), resulting in profound economic, social, and health impacts (Qiu et al., 2018); Middle East Respiratory Syndrome caused by MERS-CoV and more recently, in 2019, COVID-19 caused by the SARS-CoV-2 virus. In this study, the potential antiviral effects of a nucleoside analog, DFMA, were evaluated in various coronavirus infection models. Both in vitro and in vivo results demonstrated the promising antiviral activity of DFMA against MHV-3, MHV-A59, and SARS-CoV-2. In addition to reducing viral load across all three in vivo models, DFMA significantly decreased levels of key inflammatory mediators, including CXCL1, CCL2, and IL-6. This suggests that the reduction in viral load may also be modulating and mitigating the excessive inflammatory response, a hallmark of severe COVID-19 cases.

The COVID-19 has proven to be a disease of profound and enduring impact. In addition to the direct fatalities attributed to the illness and the consequential strain on healthcare systems worldwide, it exerts significant influence on various socio-economic dimensions (Nicola et al., 2020). Notably, acute symptoms of COVID-19 are not the only concerning aspects of this syndrome. There is also the long COVID, a multisystemic and heterogeneous syndrome characterized by various prolonged systemic alterations that extend beyond the initially reported acute pulmonary complications. Studies demonstrate that the symptoms and consequences associated with SARS-CoV-2 infection can persist for months, potentially leading to irreversible and irreparable sequelae in many fields (Davis et al., 2023; Monje & Iwasaki, 2022; Silva et al., 2021; Xie et al., 2022).

Currently, there are several vaccines approved on an emergency basis that have played a significant role in reducing and mitigating the disease cases. (Zheng et al., 2021). A major cause for concern is the emergence of new variants carrying alterations, particularly related to the viral Spike protein that have been demonstrated to be associated with immune evasion and increased transmissibility (Bhattacharya et al., 2021; Cromer et al., 2022; R. Li et al., 2021; Rössler et al., 2021; Viana et al., 2022; P. Wang et al., 2021). COVID-19 pandemic once again highlights the need for new molecules capable of reducing viral replication or even interrupting the viral replication cycle.

Here, we demonstrated the antiviral activity of DFMA, a nucleoside analog, against coronavirus infection. In previous studies, it has been demonstrated that treatment with DFMA was able to reduce the number of viral RNA copies in the supernatant of cells infected with DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4, as published by Zandi et al., (2019). In this same study, *in vivo* analyses demonstrated DFMA's ability to decrease viral titers of viable particles in the plasma, spleen, liver, and brain when administered at a dose of 10 mg/kg/day starting from the date of infection in A129 mice, as well as being associated with systemic improvements, such as reduced tissue damage, recovery of platelet levels, and lower quantifications of systemically released inflammatory mediators (Zandi et al., 2019).

The promising antiviral activity of DFMA was also studied by Del Sarto et al., (2020), demonstrating that the nucleoside analog DFMA was able to inhibit the viral replication and neuro-inflammation induced by ZKV *in vivo*, in addition to reducing lethality in mice deficient for type I interferon receptors (^{A129})(Del Sarto et al. 2020).

Until then, DFMA had only been tested against flaviviruses, which generally have a conserved RdRp enzyme among them, considered an excellent target for antiviral development (Lim et al., 2015; Rawlinson et al., 2006). Our hypothesis was that DFMA could potentially exert a similar effect against members of the *Coronaviridae* family, given that both are positive single-stranded RNA viruses.

Considering the importance of assessing the antiviral capability not only for SARS-CoV-2, but against other coronaviruses, given the fact that the *Coronaviridae* family has already presented several members with a wide capacity to cause serious impacts

on our society, the potential antiviral activity of DFMA was evaluated for MHV (Murine hepatitis virus). MHV, like SARS-CoV and SARS-CoV-2, is a betacoronavirus that infects mice naturally, capable of causing hepatitis, which can evolve into lethality of these animals. (Lucchiari et al., 1992). Working with the MHV requires laboratories and animal facilities BSL-2, unlike SARS-CoV-2 virus, which requires BSL-3 laboratories. Therefore, as demonstrated by our group, the feasibility of an MHV-3 infection model capable of causing lung damage when inoculated intranasally (Andrade et al., 2021). The model makes it possible to evaluate various parameters within BSL-2 laboratories, thus being used for screening and validation of potential antivirals with promising *in vitro* results.

Our data showed that DFMA as a promise putative antiviral, as it was able to decrease the titers of both MHV-A59 and MHV-3, reducing virus quantification in the supernatant of infected L929 cells starting from 10 μ M, similar to shown against ZKV as demonstrated by Del Sarto et al (2020) where DFMA was also able to reduce viral titers concentrations starting at 10 μ M. DFMA showed excellent *in vitro* results against SARS-CoV-2, with a modest selectivity index of 6.22, which led us to take the next step towards *in vivo* studies.

Upon transitioning to *in vivo* experiments, using a treatment protocol similar to that replicated in other studies (Del Sarto et al., 2020a; Zandi et al., 2019), DFMA significantly reduced viral load in the lungs of mice across all three infection models MHV-3, MHV-A59, and SARS-CoV-2 as measured by qPCR.

In addition, the results showed that the reduction in viral load likely resulted in effects on the production of different inflammatory mediators when quantified in the lungs of all infection models tested, as well as in the serum of mice in the experimental model of severe COVID using MHV-3. DFMA reduction of inflammatory mediators in the lungs of K18-hACE2 mice infected with SARS-CoV-2 was previously reported with the administration of molnupiravir, an antiviral molecule already approved as a drug against SARS-CoV-2 (Papinia et al., 2024).

Systemic data demonstrate that, in a severe COVID model, although DFMA reduced viral load and inflammatory mediators, it did not significantly reduce the granulocyte/lymphocyte ratio in the MHV-3 model. However, in the mild COVID model,

DFMA significantly reduced the granulocyte/lymphocyte ratio. The fact that there were no differences in the more severe COVID model raises the possibility that in the future, DFMA in synergy with some pro-resolutive drug may further enhance the prognostic and systemic effects, given that exacerbated inflammation and cytokine storm are also considered key factors in the evolution of COVID-19 patients.

In conclusion, DFMA showed promising results regarding its antiviral action both *in vitro* and *in vivo*, for MHV and SARS-CoV-2. Additionally, the fact that different members of the *Coronaviridae* family were tested suggests that DFMA may be an excellent candidate against future coronaviruses that may emerge in the coming years. Further studies need to be conducted to confirm the action and possible use of DFMA in humans. The present work demonstrates the value of using the MHV-3 and MHV-A59 as platforms for screening potential antiviral drugs against coronaviruses, depending on the mechanism of action.

5. References

- Andrade, A. C. dos S. P., Campolina-Silva, G. H., Queiroz-Junior, C. M., Oliveira, L. C. de, Lacerda, L. de S. B., Gaggino, J. C. P., Souza, F. R. O. de, Chaves, I. de M., Passos, I. B., Teixeira, D. C., Bittencourt-Silva, P. G., Valadão, P. A. C., Rossi-Oliveira, L., Antunes, M. M., Figueiredo, A. F. A., Wnuk, N. T., Jairo R. Temerozo, E., Ferreira, A. C., Cramer, A., ... Costaa, V. V. (2021). *PATHOGENESIS AND IMMUNITY A biosafety level 2 ouse model for studying Betacoronavirus- Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. September*, 1–18. <https://doi.org/>. <https://doi.org/10.1128/JVI.01276-21>.
- Bauer, R. N., Teterina, A., Shivram, H., McBride, J., Rosenberger, C. M., Cai, F., Bao, M., Tsai, L., Gordon, O., Lee, I. T., Wallin, J. J., Porter, D., Juneja, K., Camus, G., Rosas, I. O., & Wildum, S. (2023). Prognostic value of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 viral load and antibodies in patients hospitalized with COVID-19. *Clinical and Translational Science*, 16(6), 1049–1062. <https://doi.org/10.1111/cts.13511>
- Bhattacharya, M., Chatterjee, S., Sharma, A. R., Agoramoorthy, G., & Chakraborty, C. (2021). D614G mutation and SARS-CoV-2: impact on S-protein structure, function, infectivity, and immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(24), 9035–9045. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11676-2>
- Brown, A. J., Won, J. J., Graham, R. L., Dinnon, K. H., Sims, A. C., Feng, J. Y., Cihlar, T., Denison, M. R., Baric, R. S., & Sheahan, T. P. (2019). Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Research Journal*, 169(January).
- Bull-Otterson, L., Saydah, S. B. S., Boehmer, T. K., Adjei, S., Gray, S., & Harris, A. M. (2022). Post-COVID Conditions Among Adult COVID-19 Survivors Aged 18–64 and ≥65 Years.

- Morbidity and Mortality Weekly Report Post-COVID*, 71(21), 713–717. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7121e1>
- Campolina-Silva, G., Andrade, A. C. dos S. P., Couto, M., Bittencourt-Silva, P. G., Queiroz-Junior, C. M., Lacerda, L. de S. B., Chaves, I. de M., de Oliveira, L. C., Marim, F. M., Oliveira, C. A., da Silva, G. S. F., Teixeira, M. M., & Costa, V. V. (2023). Dietary Vitamin D Mitigates Coronavirus-Induced Lung Inflammation and Damage in Mice. *Viruses*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/v15122434>
- Chan, A. S., & Rout, A. (2020). Use of Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to Lymphocyte Ratios in COVID-19. *Journal of Clinical Medicine Research*, 12(7), 448–453. <https://doi.org/10.14740/jocmr4240>
- Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Cromer, D., Steain, M., Reynaldi, A., Schlub, T. E., Wheatley, A. K., Juno, J. A., Kent, S. J., Triccas, J. A., Khoury, D. S., & Davenport, M. P. (2022). Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe* 2022; January, e52–e61. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00267-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00267-6)
- Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>
- Del Sarto, J. L., Rocha, R. de P. F., Bassit, L., Olmo, I. G., Valiate, B., Queiroz-Junior, C. M., Pedrosa, C. da S. G., Ribeiro, F. M., Guimarães, M. Z., Rehen, S., Amblard, F., Zhou, L., Cox, B. D., Gavegnano, C., Costa, V. V., Schinazi, R. F., & Teixeira, M. M. (2020b). 7-Deaza-7-fluoro-2'-C-methyladenosine inhibits Zika virus infection and viral-induced neuroinflammation. *Antiviral Research*, 180(June), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104855>.
- Guimaraes, L. C., Costa, P. A. C., Scalzo Júnior, S. R. A., Ferreira, H. A. S., Braga, A. C. S., de Oliveira, L. C., Figueiredo, M. M., Shepherd, S., Hamilton, A., Queiroz-Junior, C. M., da Silva, W. N., da Silva, N. J. A., Rodrigues Alves, M. T., Santos, A. K., de Faria, K. K. S., Marim, F. M., Fukumasu, H., Birbrair, A., Teixeira-Carvalho, A., ... Guimaraes, P. P. G. (2024). Nanoparticle-based DNA vaccine protects against SARS-CoV-2 variants in female preclinical models. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44830-1>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Li, R., Liu, J., & Zhang, H. (2021). The challenge of emerging SARS-CoV-2 mutants to vaccine development. *Journal of Genetics and Genomics*, 48(2), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.03.001>
- Li, X., Liu, C., Mao, Z., Xiao, M., Wang, L., Qi, S., & Zhou, F. (2020). Predictive values of neutrophil-to-lymphocyte ratio on disease severity and mortality in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, 24(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03374-8>

- Lim, S. P., Noble, C. G., & Shi, P. Y. (2015). The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research*, 119(April), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>.
- Littlefield, K. M., Watson, R. O., Schneider, J. M., Neff, C. P., Yamada, E., Zhang, M., Campbell, T. B., Falta, M. T., Jolley, S. E., Fontenot, A. P., & Palmer, B. E. (2022). SARS-CoV-2-specific T cells associate with inflammation and reduced lung function in pulmonary post-acute sequelae of SARS-CoV-2. *PLoS Pathogens*, 18(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010359>
- Lucchiari, M. A., Pereira, C. A., Kuhn, L., & Lefkovits, I. (1992). The pattern of proteins synthesized in the liver is profoundly modified upon infection of susceptible mice with mouse hepatitis virus 3. *Res. Virol*, 143(March), 231–240.
- Mahase, E. (2021). Covid-19: Molnupiravir reduces risk of hospital admission or death by 50% in patients at risk, MSD reports. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 375(October), n2422. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2422>
- MERK. (2021). *Merck-and-Ridgebacks-Investigational-Oral-Antiviral-Molnupiravir-Reduced-the-Risk-of-Hospitalization-or-Death-by-Approximately-50-Per-C1CSM*. 1–6.
- Monje, M., & Iwasaki, A. (2022). The neurobiology of long COVID. *Cell Press*, 110, 19–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.006> SUMMARY
- Montazersaheb, S., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Hejazi, M. S., Tarhriz, V., Farjami, A., Ghasemian Sorbeni, F., Farahzadi, R., & Ghasemnejad, T. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>
- Nicola, M., Alsafi, Z., Sohrabi, C., Kerwan, A., & Al-jabir, A. (2020). The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *International Journal of Surgery*, January.
- Owen, D. R., Allerton, C. M. N., Anderson, A. S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., Boras, B., Cardin, R. D., Carlo, A., Coffman, K. J., Dantonio, A., Di, L., Eng, H., Ferre, R. A., Gajiwala, K. S., Gibson, S. A., Greasley, S. E., Hurst, B. L., Kadar, E. P., ... Zhu, Y. (2021). An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*, 374(6575), 1586–1593. <https://doi.org/10.1126/science.abl4784>
- Paneroni, M., Simonelli, C., Saleri, M., Bertacchini, L., Venturelli, M., Troosters, T., Ambrosino, N., & Vitacca, M. (2021). Muscle Strength and Physical Performance in Patients without Previous Disabilities Recovering from COVID-19 Pneumonia. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 100(2), 105–109. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001641>
- Papinia, C., Ullah, I., Amalendu P. Ranjan, Zhang, S., Wu, Q., Spasov, K. A., Zhang, C., Mothes, W., Crawford, J. M., Lindenbach, B. D., D. Uchil, P., Kumar, P., Jorgensen, W. L., & S. Anderson, K. (2024). *Proof- of- concept studies with a computationally designed Mpro inhibitor as a synergistic combination regimen alternative to Paxlovid*. 121, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.2320713121>.
- Pimenta, J. C., Beltrami, V. A., Oliveira, B. D. S., Queiroz-Junior, C. M., Barsalini, J., Teixeira, D. C., Souza-Costa, L. P. de, Lima, A. L. D., Machado, C. A., Parreira, B. Z. S. G., Santos, F. R. da S., Costa, P. A. C., Lacerda, L. D. S. B., Gonçalves, M. R., Chaves, I. de M., Couto, M. G. G. Do, Costa, V. R. de M., Nóbrega, N. R. C., Silva, B. L., ... Costa, V. V. (2024). Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice. *BioRxiv*, 2024.01.10.575003. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2024.01.10.575003>.

- Puntmann, V. O., Carerj, M. L., Wieters, I., Fahim, M., Arendt, C., Hoffmann, J., Shchendrygina, A., Escher, F., Vasa-Nicotera, M., Zeiher, A. M., Vehreschild, M., & Nagel, E. (2020). Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiology*, 5(11), 1265–1273. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557>
- Rawlinson, S., Pryor, M., Wright, P., & Jans, D. (2006). Dengue Virus RNA Polymerase NS5: A Potential Therapeutic Target? *Current Drug Targets*, 7(12), 1623–1638. <https://doi.org/10.2174/138945006779025383>
- Rössler, A., Riepler, L., Bante, D., Laer, D. von, & Kimpel, J. (2021). Correspondence SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization in Serum from Vaccinated and Convalescent Persons. *The New Engl and Journal of Medicine Corre*, 1–3.
- Silva, A., Siqueira, S., De Assis, S., De Souza Rangel, F., Santos, N. O., Freitas, S., Ribeiro, P., Tiwari, S., Alzahrani, K., Goes Neto, A., Azevedo, Va., Ghosh, P., & Barh, D. (2021). Possible Molecular Mechanisms. *Viruses*, 13(viii).
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Toots, M., Yoon, J. J., Hart, M., Natchus, M. G., Painter, G. R., & Plemper, R. K. (2020). Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model. *Translational Research*, 218, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.12.002>
- Truffaut, L., Demey, L., Bruyneel, A. V., Roman, A., Alard, S., De Vos, N., & Bruyneel, M. (2021). Post-discharge critical COVID-19 lung function related to severity of radiologic lung involvement at admission. *Respiratory Research*, 22(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01625-y>
- Urakova, N., Kuznetsova, V., Crossman, D. K., Sokratian, A., Guthrie, D. B., Kolykhalov, A. A., Lockwood, M. A., Natchus, M. G., Crowley, M. R., Painter, G. R., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2018). β -d-N⁴-Hydroxycytidine Is a Potent Anti-alphavirus Compound That Induces a High Level of Mutations in the Viral Genome. *Journal of Virology*, 92(3), 1–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.01965-17>
- Viana, R., Moyo, S., Amoako, D. G., Tegally, H., Scheepers, C., Althaus, C. L., Anyaneji, U. J., Bester, P. A., Boni, M. F., Chand, M., Choga, W. T., Colquhoun, R., Davids, M., Deforche, K., Doolabh, D., du Plessis, L., Engelbrecht, S., Everatt, J., Giandhari, J., ... de Oliveira, T. (2022). Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature*, 603(7902), 679–686. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>
- Wang, P., Nair, M. S., Liu, L., Iketani, S., Luo, Y., Guo, Y., Wang, M., Yu, J., Zhang, B., Kwong, P. D., Graham, B. S., Mascola, J. R., Chang, J. Y., Yin, M. T., Sobieszczyk, M., Kyratsous, C. A., Shapiro, L., Sheng, Z., Huang, Y., & Ho, D. D. (2021). Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*, 593(7857), 130–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Wang, Y., Zhang, D., Du, G., Du, R., Zhao, J., Jin, Y., Fu, S., Gao, L., Cheng, Z., Lu, Q., Hu, Y., Luo, G., Wang, K., Lu, Y., Li, H., Wang, S., Ruan, S., Yang, C., Mei, C., ... Summary. (2020). Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*, 395(January), 19–21.
- Xie, Y., Xu, E., Bowe, B., & Al-Aly, Z. (2022). Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19. *Nature Medicine*, 28(3), 583–590. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01689-3>

- Zandi, K., Bassit, L., Amblard, F., Cox, B. D., Hassandarvish, P., Moghaddam, E., Yueh, A., Rodrigues, G. O. L., Passos, I., Costa, V. V., AbuBakar, S., Zhou, L., Kohler, J., Teixeira, M. M., & Schinazi, R. F. (2019). Nucleoside analogs with selective antiviral activity against dengue fever and Japanese encephalitis viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AAC.00397-19>
- Zhao, Y. miao, Shang, Y. min, Song, W. bin, Li, Q. quan, Xie, H., Xu, Q. fu, Jia, J. li, Li, L. ming, Mao, H. li, Zhou, X. man, Luo, H., Gao, Y. feng, & Xu, A. guo. (2020). Follow-up study of the pulmonary function and related physiological characteristics of COVID-19 survivors three months after recovery. *EClinicalMedicine*, 25, 100463. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100463>
- Zheng, C., Shao, W., Chen, X., Zhang, B., Wang, G., & Zhang, W. (2021). Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 114 (2022)(January), 252–260.

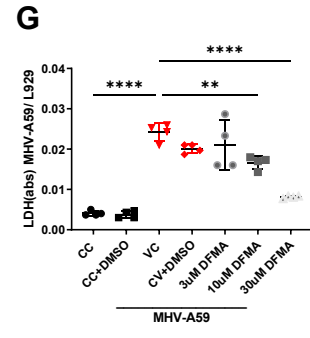
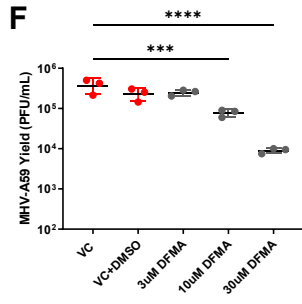
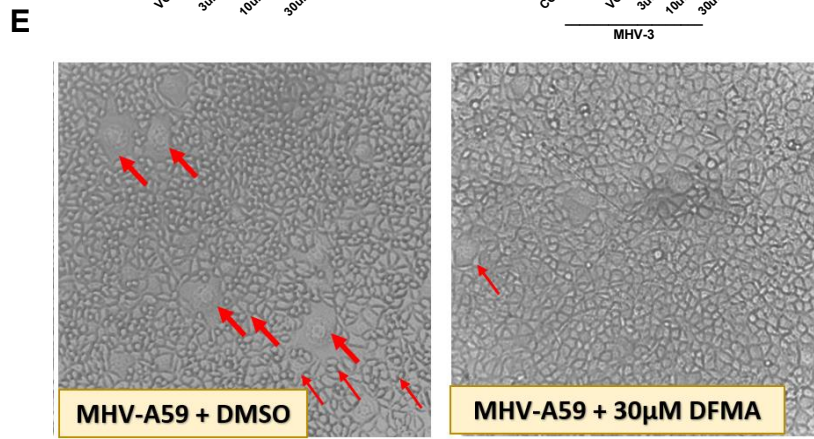
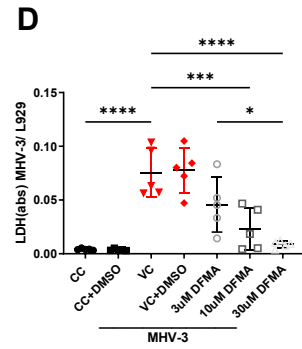
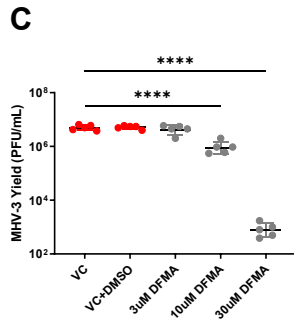
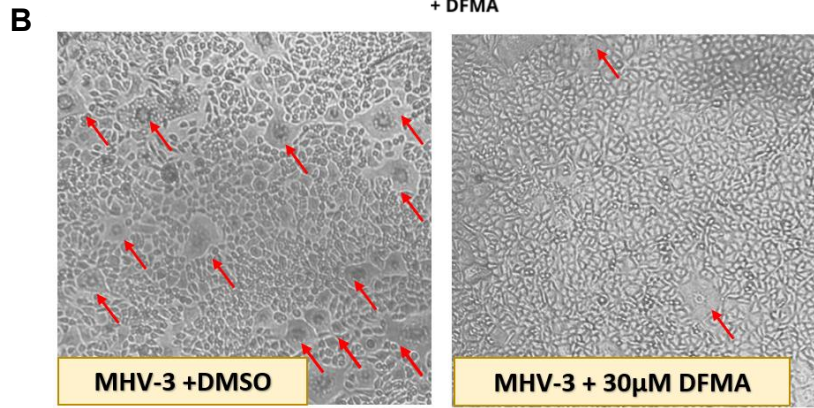
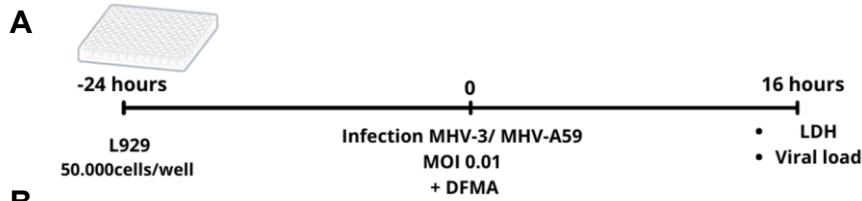


Figure 1. DFMA exhibits antiviral effects in vitro against MHV-3 and MHV-A59.

L929 cells were infected with MHV at an MOI of 0.01, and different concentrations of DFMA (3, 10 , and 30 μ M) were added simultaneously with the viral inoculum. Cell controls (CC) received only DMEM plus 1% FBS; Cell Control + DMSO (CC+DMSO) received DMEM plus 1% DMSO; Viral Control (VC) received only viral content; and VC + DMSO received viral content plus 1% DMSO. The experimental design is shown in (A). After 16 hours, cytopathic effects with or without DFMA treatment were photographed, with syncytia indicated by arrows (B). The in vitro assay included viral titer analysis in the cell supernatant (C) and an LDH assay to assess cell death, expressed as Δ absorbance/min (D). The same parameters were evaluated for MHV-A59, including representative images of the L929 monolayer (E), viral titer in the supernatant (F), and LDH assay results (G). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

Figure 2. Effects of DFMA treatment against MHV-3 infection in mice. Mice were treated every 12 hours (B.I.D), starting two days before infection, with a total dose of 10 mg/kg, until the second day post-infection. The experimental design is illustrated in (A). Mice were infected with MHV-3 and euthanized on day 3 post-infection. A second experiment was conducted to assess clinical parameters on day 5 post-infection. Viral load in lung tissue was quantified by RT-qPCR and expressed as Relative Units/20 ng of cDNA (B). Representative lung images from MHV-3-infected mice, with or without DFMA treatment, are shown. In untreated infected mice, increased inflammatory cell infiltration can be observed in lung tissue. Arrows indicate the presence of leukocytes in the alveolar and perivascular regions (C). The inflammatory score of lung tissues from different groups was compared (D). Cytokine and chemokine quantifications in lung tissue are shown for CXCL1 (E), CCL2 (F), and IL-6 (G). The same mediators were also quantified in serum: CXCL1 (H), CCL2 (I), and IL-6 (J). Blood samples were collected, and the granulocyte-to-lymphocyte ratio was determined (K). The clinical score was evaluated on day 5 post-infection (L). Group differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for panels (D), (E), (F), (G) and (J); Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for panels (I), (K), and (L); and a t-test for two-group comparisons. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001. n = 6–8.

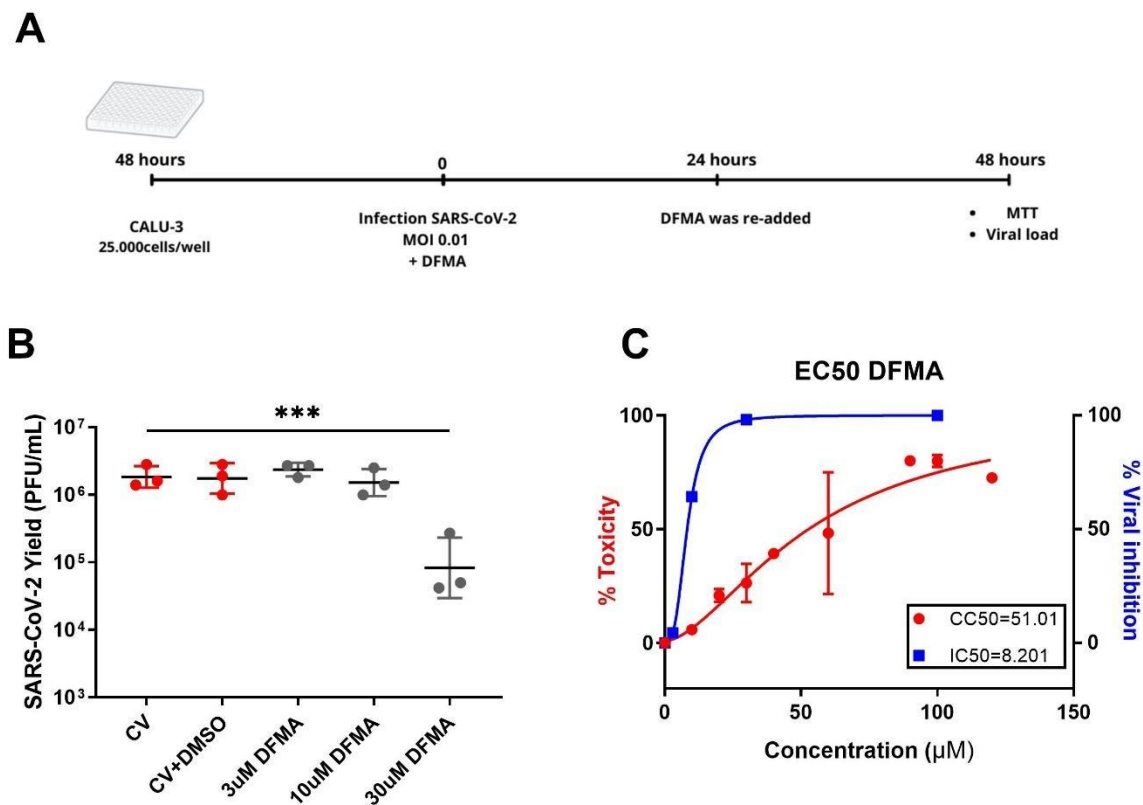


Figure 4. Antiviral activity of DFMA *In vitro* against SARS-CoV-2. Calu-3 cells were infected by SARS-CoV-2 at MOI = 0.01, along with DFMA added simultaneously in concentrations ranging from 3 to 30 μM . VC (Viral Control) received only virus, and VC+DMSO received virus plus 1% DMSO. After 24 hr exposure to DFMA, fresh solution of DFMA was applied to the corresponding wells. Experimental design was represented (A). A titration of the supernatant was performed (B). One-way ANOVA followed by Tukey was performed *** $P < 0.001$. Additionally, a cytotoxicity assay was conducted by MTT to determine the CC_{50} of 51.0 for DFMA and the EC_{50} of 8.2, assessed by nonlinear regression. This allowed the calculation of the Selectivity Index $\text{SI} = 6.2$ of DFMA (C).

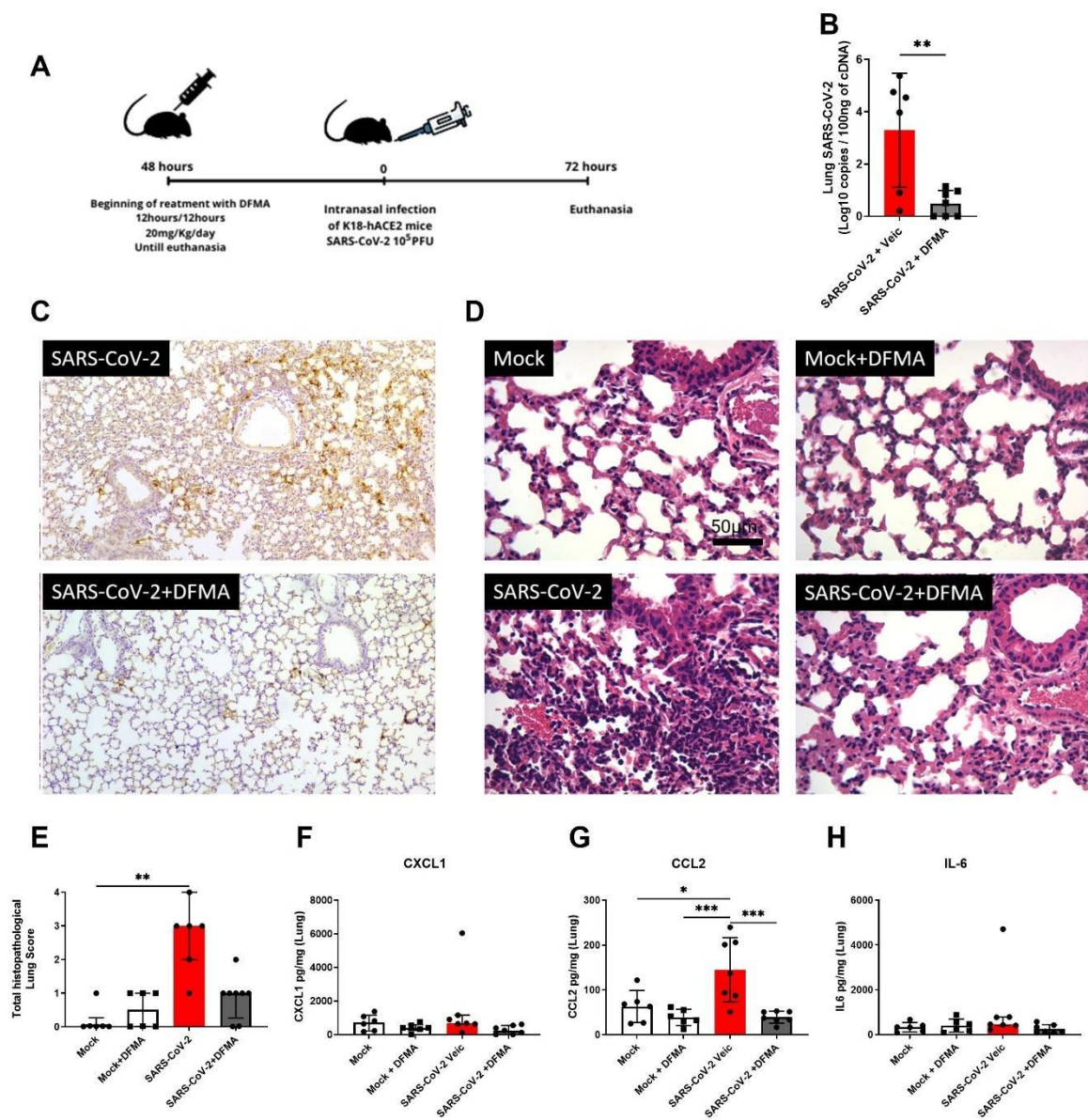


Figure 5. Effects of DFMA treatment on SARS-CoV-2 infection in K18-hACE2 mice.

K18-hACE2 mice were treated with 10 mg/kg of DFMA twice daily (B.I.D) starting two days before infection and continuing until the second day post-infection. Mice were euthanized on the third-day post-infection with SARS-CoV-2. The experimental design is illustrated in (A). Viral load in the lungs was measured by quantifying viral RNA using RT-qPCR (B). Lung tissue was also collected for histological analysis, with immunohistochemical staining of the SARS-CoV-2 Spike protein shown in (C). Representative histological images display inflammatory infiltrates in infected mice treated with vehicle control (D). Lung inflammation scores were also assessed (E), alongside the quantification of inflammatory mediators, including CXCL1 (F), CCL2 (G), and IL-6 (H). Differences between groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for panel G, and Kruskal-Wallis followed by Dunn's test for panels E, F, and H. For comparisons involving only two groups, a T-test was used. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001; n = 7-8.

Anexo 3. Anexo das capas de artigos publicados que pude fazer parte durante o período do meu doutoramento.

Preclinical development of kinetin as a safe error-prone SARS-CoV-2 antiviral able to attenuate virus-induced inflammation




[Thiago Moreno L. Souza](#) ✉, [Vagner D. Pinho](#), [Cristina F. Setim](#), [Carolina Q. Sacramento](#), [Rodrigo Marcon](#), [Natalia Fintelman-Rodrigues](#), [Otavio A. Chaves](#), [Melina Heller](#), [Jairo R. Temerozo](#), [André C. Ferreira](#), [Mayara Mattos](#), [Patrícia B. Momo](#), [Suelen S. G. Dias](#), [João S. M. Gesto](#), [Filipe Pereira-Dutra](#), [João P. B. Viola](#), [Celso Martins Queiroz-Junior](#), [Lays Cordeiro Guimarães](#), [Ian Meira Chaves](#), [Pedro Pires Goulart Guimarães](#), [Vivian Vasconcelos Costa](#), [Mauro Martins Teixeira](#), [Dumith Chequer Bou-Habib](#), [Patrícia T. Bozza](#), [Anderson R. Aquillón](#), [Jarbas Siqueira-Junior](#), [Sergio Macedo-Junior](#), [Edineia L. Andrade](#), [Guilherme P. Fadanni](#), [Sara E. L. Tolouei](#), [Francine B. Potrich](#), [Adara A. Santos](#), [Naiani F. Marques](#), [João B. Calixto](#) ✉ & [Jaime A. Rabi](#) ✉ [— Show fewer authors](#)

[Nature Communications](#) **14**, Article number: 199 (2023) | [Cite this article](#)

[Metrics](#)



A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations

Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade,^a Gabriel Henrique Campolina-Silva,^b Celso Martins Queiroz-Junior,^a Leonardo Camilo de Oliveira,^a Larisse de Souza Barbosa Lacerda,^a Jordane Clarisse Pimenta Gaggino,^a Filipe Resende Oliveira de Souza,^a **Ian de Meira Chaves,^a** Ingredy Beatriz Passos,^c Danielle Cunha Teixeira,^a Paloma Grazielle Bittencourt-Silva,^a Priscila Aparecida Costa Valadão,^a Leonardo Rossi-Oliveira,^a Maisa Mota Antunes,^a André Felipe Almeida Figueiredo,^a Natália Teixeira Wnuk,^a  Jairo R. Temezo,^{e,f} André Costa Ferreira,^{g,h,i} Allysson Cramer,^b Cleida Aparecida Oliveira,^a  Ricardo Durães-Carvalho,^j Clarice Weis Arns,^j Pedro Pires Goulart Guimarães,^d Guilherme Mattos Jardim Costa,^a Gustavo Batista de Menezes,^a Cristina Guatimosim,^a Glauber Santos Ferreira da Silva,^d Thiago Moreno L. Souza,^{g,h} Breno Rocha Barrioni,^k Marivalda de Magalhães Pereira,^k Lirlândia Pires de Sousa,^l Mauro Martins Teixeira,^b  Vivian Vasconcelos Costa^{a,b}

^aDepartment of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^cDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^dDepartment of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^eLaboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^fNational Institute for Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^gNational Institute for Science and Technology on Innovation on Diseases of Neglected Populations (INCT/IDNP), Center for Technological Development in Health (CDTS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^hImmunopharmacology Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ⁱLaboratório de Pesquisas Pré-clínicas, Universidade Iguazu (UNIG), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^jLaboratory of Virology, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^kDepartment of Metallurgical Engineering and Materials, Federal University of Minas Gerais, School of Engineering, Belo Horizonte, Brazil



^lDepartment of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade and Gabriel Henrique Campolina-Silva contributed equally to this work. Co-first authorship order was determined based on who initiated the study.



Article

Dietary Vitamin D Mitigates Coronavirus-Induced Lung Inflammation and Damage in Mice

Gabriel Campolina-Silva^{1,2,3,*,†}, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade^{1,2,3,†}, Manoela Couto¹, Paloma G. Bittencourt-Silva⁴, Celso M. Queiroz-Junior¹, Larisse de Souza B. Lacerda¹, **Ian de Meira Chaves¹**, Leonardo C. de Oliveira², Fernanda Martins Marim⁵, Cleida A. Oliveira¹ , Glauber S. F. da Silva⁴, Mauro Martins Teixeira²  and Vivian Vasconcelos Costa^{1,2,*}

¹ Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30270-901, MG, Brazil; anaclaudiaandrade29@gmail.com (A.C.d.S.P.A.); larissesbl.adv@gmail.com (L.d.S.B.L.); iandemeirachaves@hotmail.com (I.d.M.C.); cleida@icb.ufmg.br (C.A.O.)

² Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30270-901, MG, Brazil; ldeolive2@gmail.com (L.C.d.O.); mmtex.ufmg@gmail.com (M.M.T.)

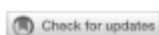
³ CHU de Québec Research Center (CHUL), Université Laval, Québec, QC G1V 4G2, Canada

⁴ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30270-901, MG, Brazil; glauber@gmail.com (G.S.F.d.S.)

⁵ Department of Genetics, Ecology and Evolution, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30270-901, MG, Brazil

* Correspondence: gcampolina@crchudequebec.ulaval.ca (G.C.-S.); vivianvcosta@ufmg.br (V.V.C.)

† These authors contributed equally to this work.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Timur O. Yarovinsky,
Yale University, United States

REVIEWED BY
Theodore Cory,
University of Tennessee Health Science
Center (UTHSC), United States
Nicolas Réau,
UMR7355 Immunologie et Neurogénétique
Expérimentales et Moléculaires (INEM), France

*CORRESPONDENCE
Flávio Almeida Amaral
✉ famaral@ufmg.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

RECEIVED 29 January 2024

ACCEPTED 29 March 2024

PUBLISHED 15 April 2024

CITATION
Oliveira VLS, Queiroz-Junior CM,
Hoorelbeke D, Santos FRdS, Chaves IdM,
Teixeira MM, Russo RdC, Proost P, Costa VV,
Struyf S and Amaral FA (2024) The
glycosaminoglycan-binding chemokine
fragment CXCL9(74–103) reduces
inflammation and tissue damage in mouse
models of coronavirus infection.
Front. Immunol. 15:1378591.
doi: 10.3389/fimmu.2024.1378591

COPYRIGHT
© 2024 Oliveira, Queiroz-Junior, Hoorelbeke,
Santos, Chaves, Teixeira, Russo, Proost, Costa,
Struyf and Amaral. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
The use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

The glycosaminoglycan-binding chemokine fragment CXCL9(74–103) reduces inflammation and tissue damage in mouse models of coronavirus infection

Vivian Louise Soares Oliveira^{1,2}, Celso Martins Queiroz-Junior³,
Delphine Hoorelbeke², Felipe Rocha da Silva Santos³,
Ian de Meira Chaves³, Mauro Martins Teixeira¹,
Remo de Castro Russo⁴, Paul Proost², Vivian Vasconcelos Costa³,
Sofie Struyf^{2†} and Flávio Almeida Amaral^{1*†}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium, ³Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Introduction: Pulmonary diseases represent a significant burden to patients and the healthcare system and are one of the leading causes of mortality worldwide. Particularly, the COVID-19 pandemic has had a profound global impact, affecting public health, economies, and daily life. While the peak of the crisis has subsided, the global number of reported COVID-19 cases remains significantly high, according to medical agencies around the world. Furthermore, despite the success of vaccines in reducing the number of deaths caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), there remains a gap in the treatment of the disease, especially in addressing uncontrolled inflammation. The massive recruitment of leukocytes to lung tissue and alveoli is a hallmark factor in COVID-19, being essential for effectively responding to the pulmonary insult but also linked to inflammation and lung damage. In this context, mice models are a crucial tool, offering valuable insights into both the pathogenesis of the disease and potential therapeutic approaches.

Methods: Here, we investigated the anti-inflammatory effect of the glycosaminoglycan (GAG)-binding chemokine fragment CXCL9(74–103), a molecule that potentially decreases neutrophil transmigration by competing with chemokines for GAG-binding sites, in two models of pneumonia caused by coronavirus infection.

Results: In a murine model of betacoronavirus MHV-3 infection, the treatment with CXCL9(74–103) decreased the accumulation of total leukocytes, mainly neutrophils, to the alveolar space and improved several parameters of lung dysfunction 3 days after infection. Additionally, this treatment also reduced the lung damage. In the SARS-CoV-2 model in K18-hACE2-mice, CXCL9(74–103) significantly improved the clinical manifestations of the disease, reducing pulmonary damage and decreasing viral titers in the lungs.



Angiotensin-(1–7) decreases inflammation and lung damage caused by betacoronavirus infection in mice

Erick Bryan de Sousa Lima^{1,2} · Antônio Felipe S. Carvalho^{1,2} · Isabella Zaidan³ · Adelson Héric A. Monteiro³ · Camila Cardoso³ · Edvaldo S. Lara¹ · Fernanda S. Carneiro¹ · Leonardo C. Oliveira⁴ · Filipe Resende⁵ · Felipe Rocha da Silva Santos⁴ · Luiz Pedro Souza-Costa⁴ · Ian de Meira Chaves⁵ · Celso M. Queiroz-Junior⁵ · Remo C. Russo⁶ · Robson A. S. Santos⁷ · Luciana P. Tavares⁸ · Mauro M. Teixeira⁴ · Vivian V. Costa⁵ · Lirlândia P. Sousa^{1,3}

Received: 4 June 2024 / Revised: 30 August 2024 / Accepted: 10 September 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2024

Abstract

Objective Pro-resolving molecules, including the peptide Angiotensin-(1–7) [Ang-(1–7)], have potential adjunctive therapy for infections. Here we evaluate the actions of Ang-(1–7) in betacoronavirus infection in mice.

Methods C57BL/6J mice were infected intranasally with the murine betacoronavirus MHV-3 and K18-hACE2 mice were infected with SARS-CoV-2. Mice were treated with Ang-(1–7) (30 µg/mouse, i.p.) at 24-, 36-, and 48-hours post-infection (hpi) or at 24, 36, 48, 72, and 96 h. For lethality evaluation, one additional dose of Ang-(1–7) was given at 120 hpi. At 3- and 5-days post- infection (dpi) blood cells, inflammatory mediators, viral loads, and lung histopathology were evaluated.

Results Ang-(1–7) rescued lymphopenia in MHV-infected mice, and decreased airways leukocyte infiltration and lung damage at 3- and 5-dpi. The levels of pro-inflammatory cytokines and virus titers in lung and plasma were decreased by Ang-(1–7) during MHV infection. Ang-(1–7) improved lung function and increased survival rates in MHV-infected mice. Notably, Ang-(1–7) treatment during SARS-CoV-2 infection restored blood lymphocytes to baseline, decreased weight loss, virus titers and levels of inflammatory cytokines, resulting in improvement of pulmonary damage, clinical scores and lethality rates.

Conclusion Ang-(1–7) protected mice from lung damage and death during betacoronavirus infections by modulating inflammation, hematological parameters and enhancing viral clearance.

Keywords Covid-19 · Coronavirus · MHV-3 · SARS-CoV-2 · Angiotensin-(1–7)



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuint

Neuromuscular defects after infection with a beta coronavirus in mice

Leonardo Rossi^a, Kivia B.S. Santos^a, Barbara I.S. Mota^a, Jordane Pimenta^a, Bruna Oliveira^a, Caroline A. Machado^a, Heliana B. Fernandes^a, Leticia A. Barbosa^a, Hermann A. Rodrigues^d, Gabriel H.M. Teixeira^a, Gabriel A. Gomes-Martins^a, Gabriel F. Chaimowicz^a, Celso Martins Queiroz-Junior^a, **Ian Chaves**^a, Juan C. Tapia^c, Mauro M. Teixeira^b, Vivian V. Costa^a, Aline S. Miranda^a, Cristina Guatimosim^{a,*}

^a Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c School of Medicine, University of Talca, Talca, Chile

^d Departamento de Ciências Básicas da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG, Brazil

A B S T R A C T

COVID-19 affects primarily the lung. However, several other systemic alterations, including muscle weakness, fatigue and myalgia have been reported and may contribute to the disease outcome. We hypothesize that changes in the neuromuscular system may contribute to the latter symptoms observed in COVID-19 patients. Here, we showed that C57BL/6J mice inoculated intranasally with the murine betacoronavirus hepatitis coronavirus 3 (MHV-3), a model for studying COVID-19 in BSL-2 conditions that emulates severe COVID-19, developed robust motor alterations in muscle strength and locomotor activity. The latter changes were accompanied by degeneration and loss of motoneurons that were associated with the presence of virus-like particles inside the motoneuron. At the neuromuscular junction level, there were signs of atrophy and fragmentation in synaptic elements of MHV-3-infected mice. Furthermore, there was muscle atrophy and fiber type switch with alteration in myokines levels in muscles of MHV-3-infected mice. Collectively, our results show that acute infection with a betacoronavirus leads to robust motor impairment accompanied by neuromuscular system alteration.



Article

Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion

Gabriel Gonçalves de Freitas^{1,2}, João Martins Barbosa^{1,2}, Carlos José Correia de Santana^{1,2}, Ana Carolina Martins Magalhães¹, Keven Wender Rodrigues Macedo¹, Jéssica Oliveira de Souza¹, Jessica Schneider de Castro¹, Isadora Alves de Vasconcelos¹, Amanda Araújo Souza³, Sonia Maria de Freitas⁴, Sônia Nair Bão⁵, Samuel Ribeiro Costa⁶, Guilherme Dotto Brand⁶, **Ian de Meira Chaves**⁷, Vivian Vasconcelos Costa⁷, Wagner Fontes², Osmindo Rodrigues Pires Júnior¹ and Mariana S. Castro^{1,2,*}

¹ Laboratory of Toxinology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil

² Laboratory of Protein Chemistry and Biochemistry, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil

³ Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas 13083-970, SP, Brazil

⁴ Laboratory of Biophysics, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil


⁵ Electron Microscopy Laboratory, Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil

⁶ Laboratory of Synthesis and Analysis of Biomolecules, Institute of Chemistry, University of Brasilia, Brasilia 70.910-900, DF, Brazil

⁷ Center for Research and Development of Pharmaceuticals, Department of Morphology, Institute of Biological




Anexo 4. Artigos publicados durante o meu doutoramento em que fui primeiro ou segundo autor, referente ao trabalho executado durante o Mestrado.



Original Article
<http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0238>

Dysbiotic oral microbiota contributes to alveolar bone loss associated with obesity in mice

Ian de Meira CHAVES*
 Marina Campos ZICKER²
 Alice de Oliveira LARANJEIRA¹
 Ana Leticia Malheiros SILVEIRA^{3,4}
 Daniele Cristina de AGUIAR⁴
 Breno Rocha BARRIONI⁶
 Adaliene Versiani de Matos FERREIRA²
 Mauro Martins TEIXEIRA³
 Tarcilia Aparecida da SILVA⁶
 Daniele da Glória de SOUZA¹
 Mila Fernandes Moreira MADEIRA^{1*} 

Abstract

Periodontal diseases (PD) are inflammatory conditions that affect the teeth supporting tissues. Increased body fat tissues may contribute to activation of the systemic inflammatory response, leading to comorbidities. Some studies have shown that individuals with obesity present higher incidence of PD than eutrophics. Objective: To investigate the impact of obesity on periodontal tissues and oral microbiota in mice. Methodology: Two obesity mice models were performed, one using 12 weeks of the dietary protocol with a high-fat (HF) diet in C57BL/6 mice and the other using leptin receptor-deficient mice (*db/db*), which became spontaneously obese. After euthanasia, a DNA-DNA hybridization technique was employed to evaluate the microbiota composition and topical application of chlorhexidine (CHX), an antiseptic, was used to investigate the impact of the oral microbiota on the alveolar bone regarding obesity. Results: Increased adipose tissue may induce alveolar bone loss associated with periodontal disease in the rodent obesity studies.

Inflammation Research (2023) 72:859–873
<https://doi.org/10.1007/s00011-023-01711-5>

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



SOCS2 regulates alveolar bone loss in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease

Mariana Rates Gonzaga Santos¹ · Ian de Meira Chaves² · Celso Martins Queiroz-Junior³ · Allysson Thiago Cramer¹ · Thales Augusto Anestino² · Anna Clara Paiva Menezes dos Santos² · Paulo Gaio Leite¹ · Soraia Macari⁴ · Breno Rocha Barrioni⁵ · Marivalda de Magalhães Pereira⁵ · Mauro Martins Teixeira^{1,6} · Danielle da Glória de Souza² · Mila Fernandes Moreira Madeira² · Fabiana Simão Machado^{1,6}

Received: 3 November 2022 / Revised: 19 December 2022 / Accepted: 16 February 2023 / Published online: 13 March 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

Abstract

Introduction The role of suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*)-induced alveolar bone loss is unknown; thus, it was investigated in this study.

Methods Alveolar bone loss was induced by infecting C57BL/6 wild-type (WT) and *Socs2*-knockout (*Socs2*^{-/-}) mice with *Aa*. Bone parameters, bone loss, bone cell counts, the expression of bone remodeling markers, and cytokine profile were evaluated by microtomography, histology, qPCR, and/or ELISA. Bone marrow cells (BMC) from WT and *Socs2*^{-/-} mice were differentiated in osteoblasts or osteoclasts for analysis of the expression of specific markers.

Results *Socs2*^{-/-} mice intrinsically exhibited irregular phenotypes in the maxillary bone and an increased number of osteoclasts. Upon *Aa* infection, SOCS2 deficiency resulted in the increased alveolar bone loss, despite decreased proinflammatory cytokine production, in comparison to the WT mice. In vitro, SOCS2 deficiency resulted in the increased osteoclasts formation, decreased expression of bone remodeling markers, and proinflammatory cytokines after *Aa* LPS stimulus.

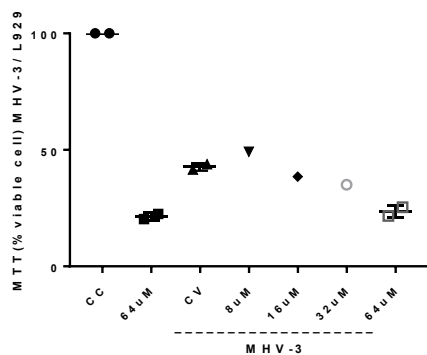
Anexo 4. Resultados obtidos em colaboração

Anexo de resultados obtidos em testes de colaboração, contudo, os compostos foram citotóxicos às células L929. Foram testados os peptídeos Rsp-3, Rsp-6 e RspBI1 fornecidos pela professora Mariana S. Castro da Universidade de Brasília em concentrações de 8 μ M a 64 μ M. Nossos resultados mostraram que a maior concentração de todos os compostos testados apresentou alta toxicidade para a célula, o que pode ser observado tanto no ensaio MTT quanto no LDH. Além disso, a infecção por MHV-3 foi capaz de reduzir a viabilidade celular após 16 horas de infecção, por outro lado, nenhum dos compostos testados apresentou tendências de melhora nos parâmetros de MTT e LDH das células infectadas com MHV-3 nas concentrações testadas.

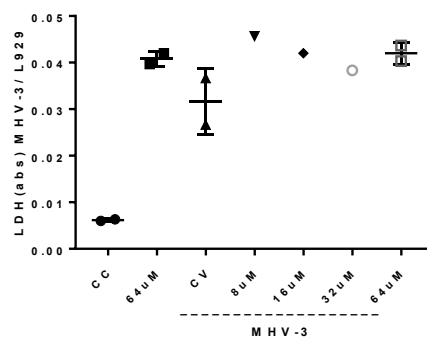
Figura 11 Figura: Ensaio de citotoxicidade avaliado em células L929 infectadas com o vírus MHV-3 e tratadas com diferentes concentrações dos peptídeos. Os efeitos dos peptídeos Rsp- BI1, Rsp6 e Rsp3 na viabilidade celular foram avaliados em células L929 infectadas com MHV-3 (MOI=0.01) através de ensaio de MTT (A;C;E) e LDH (B;D;F) respectivamente. Os peptídeos foram testados em concentrações de 64 μ M, 32 μ M, 16 μ M e 8 μ M. O controle celular (CC) recebeu somente DMEM com 1% de SFB.

A

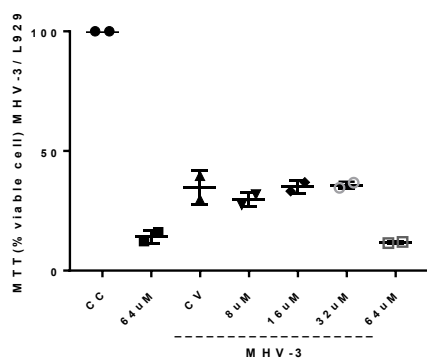
R sp - B 11

**B**

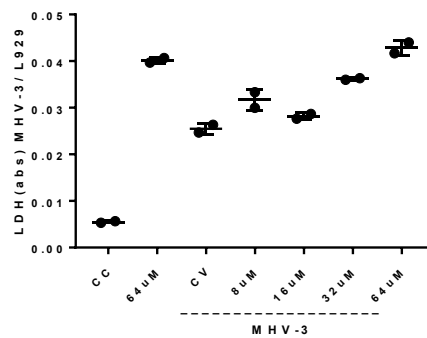
R sp - B 11

**C**

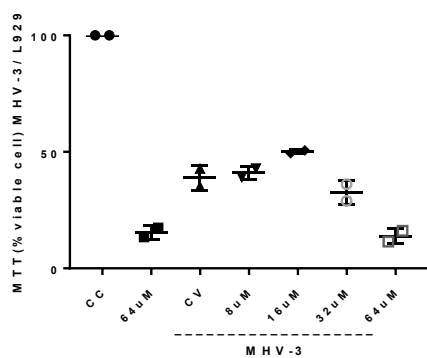
R sp - 6

**D**

R sp - 6

**E**

R sp - 3

**F**

R sp - 3

