



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

GEOVANE MARQUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUCOLÍTICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
BROMAC® APLICADO AO TRATAMENTO DA COVID-19**

BELO HORIZONTE

2023

Geovane Marques Ferreira

**Avaliação da atividade mucolítica e anti-inflamatória do BromAc®
aplicado ao tratamento da COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis.

Belo Horizonte, MG

2023

043

Ferreira, Geovane Marques.

Avaliação da atividade mucolítica e antiinflamatória do Bromac® aplicado ao tratamento da Covid-19 [manuscrito] / Geovane Marques Ferreira. – 2023.
77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Covid-19. 3. Bromelaínas. 4. Acetilcisteína. I. Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **GEOVANE MARQUES FERREIRA**

Nº REGISTRO: **2021662750**

Às **14:00** horas do dia **17 de abril de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (Instituto René Rachou - FIOCRUZ/Minas) e a Profa. Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis (Orientadora), para julgar o trabalho final "**Avaliação da atividade mucolítica e anti-inflamatória do BROMAC® aplicada ao tratamento do Covid-19**", do aluno **Geovane Marques Ferreira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a 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. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 17 de abril de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli
Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

De acordo:

Profa. Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis
(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 18/04/2023, às 08:14, 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 **Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Professora do Magistério Superior**, em 18/04/2023, às 08:29, 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 **Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal, Usuário Externo**, em 18/04/2023, às 09:10, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 18/04/2023, às 11:26, 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 **2163531** e o código CRC **7AD84109**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de realizar meu mestrado e por fornecerem o ambiente acadêmico propício para a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à minha orientadora, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, pela sua dedicação, orientação e suporte ao longo de todo o processo de elaboração desta dissertação. Sua expertise e disponibilidade foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico.

Desejo agradecer aos membros da banca examinadora, Edel Figueiredo Barbosa Stancioli e Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal, por dedicarem seu tempo e conhecimento na avaliação deste trabalho. Suas contribuições e sugestões enriqueceram significativamente a dissertação.

Expresso minha gratidão aos meus colegas de pesquisa do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada. A colaboração e troca de ideias com vocês foram inestimáveis para o desenvolvimento do meu trabalho. Gostaria de agradecer especialmente aos professores Edel Stancioli e Flávio da Fonseca, cujo conhecimento e orientação foram essenciais para a minha formação.

Não posso deixar de agradecer minha família, Sandra, José, Evandro e Jéssica, bem como todos meus familiares, pelo apoio incondicional ao longo dessa jornada. Seu amor, incentivo e compreensão foram fundamentais para minha conquista.

Por fim, gostaria de agradecer às agências financiadoras FAPEMIG, CNPq e, em particular, à Mucpharm. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença letal causada pela pandemia SARS-CoV-2, que permanece uma ameaça à saúde pública há mais de três anos. Em contraste com a gravidade do COVID-19, até o momento, existem poucos medicamentos capazes de prevenir ou retardar o desenvolvimento do COVID-19 grave de forma eficiente. Mais importante, ainda são escassos os estudos com foco em compostos administradas por via intranasal para agir mais rapidamente nas vias aéreas e muco de indivíduos com COVID-19 grave sob ventilação mecânica. Nesse sentido, BromAc® é uma combinação de bromelina e acetilcisteína (NAC), atualmente utilizada para o tratamento de pseudomixoma (Fase 3) e tem sido estudada para o reposicionamento no tratamento de COVID-19. Portanto, no presente estudo, procurou-se examinar o efeito mucolítico e anti-inflamatório do BromAc® *ex-vivo* em amostras de aspirado traqueal de pacientes críticos com COVID-19 sob ventilação mecânica e o efeito anti-inflamatório de BromAc® em um sistema *in vitro* utilizando células do sangue periférico estimuladas com o SARS-CoV-2 inativado. Nossos resultados demonstraram que o BromAc® exibiu um efeito mucolítico robusto em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 de maneira dose-dependente. Além disso, o BromAc® demonstrou atividade anti-inflamatória, reduzindo a ação da tempestade de citocinas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 e nos sobrenadantes de cultura. A combinação apresentou redução de quimiocinas, em comparação com NAC isoladamente. Foi também observado a ação dos compostos combinados sobre citocinas reguladoras como IL-10. Além disso, o BromAc® foi capaz de modular as populações celulares CD16⁺ e CD14⁺ após o tratamento *in vitro* de células sanguíneas com BromAc®. Esses resultados indicam um efeito mucolítico e anti-inflamatório robusto do BromAc® em aspirados traqueais de pacientes críticos, indicando seu potencial como estratégia terapêutica para o COVID-19. Ensaios clínicos são necessários para definir a segurança e a eficácia do BromAc® no tratamento da doença, que tem sido o maior desafio do século XXI.

Palavras-chave: Microbiologia. COVID-19. Bromelaínas. Acetilcisteína.

ABSTRACT

COVID-19 is a deadly disease caused by the SARS-CoV-2 pandemic, which has remained a public health threat for over three years. In contrast to the severity of COVID-19, so far, there are few drugs capable of efficiently preventing or delaying the development of severe COVID-19. More importantly, studies focusing on compounds controlled intranasally to act more quickly in the airways and mucous membranes of individuals with severe COVID-19 under mechanical ventilation are still reduced. In this sense, BromAc® is a combination of bromelain and acetylcysteine (NAC), currently used for the treatment of pseudomyxoma (Phase 3) and has been studied for repositioning in the treatment of COVID-19. Therefore, in the present study, we sought to examine the mucolytic and anti-inflammatory effect of BromAc® *ex-vivo* in a sample of tracheal aspirates from critically ill patients with COVID-19 under mechanical ventilation and the anti-inflammatory effect of BromAc® in an *in vitro* system using peripheral blood cells stimulated with inactivated SARS-CoV-2. Our results sadden that BromAc® exhibited a robust mucolytic effect in the exception of tracheal aspirates from patients with COVID-19 in a dose-dependent manner. In addition, BromAc® has demonstrated anti-inflammatory activity, reducing the cytokine storm in the tracheal aspirate samples from patients with COVID-19 and in culture supernatants. The combination showed reduced chemokines compared to NAC individually. The action of the combined compounds on regulatory cytokines such as IL-10 was also observed. Furthermore, BromAc® was able to modulate CD16⁺ and CD14⁺ cells after *in vitro* treatment of blood cells with BromAc®. These results indicate a robust mucolytic and anti-inflammatory effect of BromAc® in tracheal aspirates from critically ill patients, indicating its potential as a therapeutic strategy for COVID-19. Clinical trials are needed to define the safety and efficacy of BromAc® in the treatment of the disease, which has been the greatest challenge of the 21st century.

Keywords: Microbiology. COVID-19. Bromelains. Acetylcysteine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Análise comparativa de três surtos de coronavírus do século XXI incluindo SARS-CoV, MERS-CoV e COVID-19. A imagem indica os diferentes hospedeiros primários e secundários, os anos em que ocorreram os surtos e a origem dos coronavírus citados. Ainda são mostrados as regiões afetadas e as mortes reportadas, juntamente com a letalidade dos coronavírus humanos (SAMUDRALA et.al., 2020)..... 17
- Figura 2:** Origens animais dos coronavírus humanos. Os coronavírus possuem diferentes hospedeiros naturais e intermediários, as setas indicam o tipo de desfecho da infecção subsequente (CUI, et. al., 2018)..... 19
- Figura 3:** Elementos estruturais do vírus, incluindo a proteína spike (S), envelope (E), membrana (M) e componentes internos, como o RNA de fita simples viral e as proteínas do nucleocapsídeo (N), assim como os componentes do genoma SARS-CoV-2. O genoma de cerca de 30kb codifica dois macropolipeptídeos (Pp1a e pp1b), além das proteínas estruturais e fatores acessórios (JAMISON, et. al., 2022). 21
- Figura 4:** Esquema da imunopatogênese da infecção por SARS-CoV-2. A figura ilustra várias estratégias e eventos deletérios envolvidos na patogênese do SARS-CoV-2, juntamente com suas consequências patológicas. A entrada viral inicial ocorre nos alvéolos epiteliais, onde o vírus se liga ao ACE2 através da proteína S. (ZHANG, et, al., 2020). 26
- Figura 5:** Visão geral dos principais compostos estudados para tratamento da COVID-19 e sítios de ação. A patogênese do COVID-19 é possui dois cursos: a infecção precoce envolve a replicação viral, enquanto a infecção tardia leva a danos nos tecidos devido à resposta inflamatória excessiva. Tanto as proteínas virais quanto os fatores do hospedeiro são importantes para a patogênese da COVID-19 e alvos potenciais para a terapia antiviral (ZHOU, et. al., 2021). 28
- Figura 6:** Sítio de ação do PF-07321332 e do molnupiravir. O composto da Pfizer possui atuação na principal protease do SARS-CoV-2 (mPro) enquanto o Molnupiravir da Merck, inibe a replicação do RNA viral ao inibir a enzima RdRp (COUZIN-FRANKEL, 2021)..... 32
- Figura 7:** Efeito do BromAc® em amostras de aspirado traqueal de oito pacientes com COVID-19 usando o método de fluxo contínuo. **A:** O volume do

fluxo em microlitros é representado em gráficos de dispersão com mediana e intervalo interquartilico para uma curva com 0, 125 e 250µg de bromelina além de 2% NAC. **B:** Aspecto visual da amostra de aspirado traqueal antes e após o tratamento BromAc® 250µg. 46

Figura 8: Correlação do efeito mucolítico do BromAc® com a celularidade da amostra de aspirado traqueal. Os gráficos de dispersão XY demonstram os resultados de celularidade, incluindo contagem total de células **(A)** e contagem de células vivas **(B)** de acordo com o volume de fluxo em microlitros. 47

Figura 9: Medições reológicas de amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 não tratados (UN) e após tratamento com N-acetilcisteína (NAC), BromAc® 250 µg. **A:** Resultados de viscosidade plotados como gráficos de dispersão sobre barras flutuantes expressando mínimo e máximo, bem como a linha média. Efeito na viscosidade em função da taxa de cisalhamento **(B)** expressa em seg-1 e ao longo do tempo **(C)** expressa em minutos. **D:** Análise de mapa de calor demonstrando a intensidade da viscosidade em amostras individuais. A legenda de cores é fornecida na figura mostrando a viscometria mais alta (vermelha) e mais baixa (azul)(cP) e Velocidade (rpm). 48

Figura 10: Efeito do BromAc® nas quimiocinas presentes na amostra de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19. Os resultados das quimiocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL. 50

Figura 11: Efeito de BromAc® em citocinas pró-inflamatórias presentes em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados de citocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL. 51

Figura 12: Efeito do BromAc® nos fatores de crescimento presentes nos aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados para fatores de crescimento foram medidos por Luminex e expressos em pg/mL..... 52

Figura 13: Efeito de BromAc® em citocinas reguladoras presentes em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados de citocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL. 53

Figura 14: Impacto do BromAc® em quimiocinas induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes

tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL (escala log)..... 54

Figura 15: Impacto do BromAc® em citocinas pró-inflamatórias induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL. 55

Figura 16: Impacto do BromAc® em fatores de crescimento induzidos exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL. 56

Figura 17: Impacto do BromAc® em citocinas reguladores induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ocorrência da COVID-19 por região federativa no Brasil até 21 de março de 2023 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).....	23
Tabela 2: Anticorpos marcadores de superfícies e intracitoplasmáticos.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Taxonomia, classificação e histórico dos Coronavírus.....	16
1.2 Constituição do SARS-CoV-2.....	20
1.3 Epidemiologia, fatores de risco e manifestações clínicas	22
1.4 Diagnóstico e vacina.....	23
1.5 Resposta imune da infecção pelo SARS-CoV-2	24
1.6 Tratamento da COVID-19	27
1.6.1 Mecanismos de ação: Vírus-específico	29
1.6.2 Principais antivirais em uso contra SARS-CoV-2	30
1.6.3 Principais moduladores da inflamação para o tratamento da COVID-19	32
1.7 BromAc®.....	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVO GERAL	38
3.1 Objetivos Específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 BromAc®.....	39
4.2 Amostras de Pacientes	39
4.3 Ensaio de fluxo direto.....	40
4.4 Medidas reométricas.....	40
4.5 Avaliação de mediadores inflamatórios imunológicos em amostras de aspirado traqueal de pacientes COVID-19 por Luminex.....	41
4.6 Avaliação do perfil anti-inflamatório de BromAc® frente ao estímulo de células provenientes do sangue periférico com SARS-CoV-2 in vitro.	42
4.7 Análise Estatística.....	44
5. RESULTADOS	46
5.1 Atividade Mucolítica do BromAc® em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19.....	46

5.2 Perfil de resposta mediada por quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento após tratamento com BromAc® em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19.....	49
5.3 Avaliação do Perfil de mediadores solúveis da resposta imune induzida por SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> após tratamento com BromAc® em células leucocitárias do sangue periférico	53
5.4 Avaliação do Perfil de resposta imune celular modulada por BromAc® frente a estimulação <i>in vitro</i> com SARS-CoV-2	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO.....	67
8. REFERÊNCIAS	69
9. ANEXOS.....	79

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, um surto de pneumonia sem causa detectada foi atribuído a um grupo de pessoas que trabalharam ou frequentaram um mercado de frutos do mar em Wuhan, província de Hubei na China. Em 31 de dezembro o *Center of Disease Control* Chinês (China CDC) atribuiu um grupo de pesquisadores para conduzir uma investigação etiológica e epidemiológica para identificar a origem da pneumonia que afligia a esses pacientes. Após um estudo que utilizou amostras de lavados bronco-alveolares dos pacientes descobriu-se um betacoronavírus até então desconhecido. Utilizando células epiteliais infectadas do sistema respiratório e por meio do método de PCR foi isolado um novo coronavírus, nomeado 2019-nCoV (ZHU et al., 2020).

Desde então ocorreu uma distribuição global do vírus, até que em 11 de março de 2020 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a pandemia do novo Coronavírus, o COVID-19 (*Coronavirus Disease-2019*). O crescente número de casos e novas variantes que vão surgindo pelo mundo, juntamente às epidemias que ocorreram anteriormente indicam que os Coronavírus representam uma grande ameaça aos seres humanos e à economia mundial, pois espalham com muita facilidade, emergem inesperadamente e podem levar a consequências até então incalculáveis (LI et al., 2020).

Para facilitar o entendimento e a comunicação entre as equipes de pesquisa de todo o mundo, o *Coronaviridae Study Group* (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus decidiu renomear o 2019-nCoV, baseado em características filogenéticas, taxonomia e considerando aspectos da sintomatologia conhecidos. A partir de março de 2020 o *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV-2), Coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave é o nome que passou a ser referido o novo coronavírus (CSG, 2020).

O SARS-CoV-2, portanto, representa um grande desafio aos serviços de saúde mundiais e para os pesquisadores que estão trabalhando arduamente para desvendar todos os segredos deste novo vírus. Sendo assim é de extrema

importância incentivar a pesquisa e o estudo sobre a COVID-19 e identificar os aspectos de virulência e patogenicidade do vírus, assim como entender os aspectos da resposta imune do paciente acometido com a doença possibilita o aperfeiçoamento de vacinas e o desenvolvimento de fármacos antivirais para o tratamento precoce, até então escasso.

1.1 Taxonomia, classificação e histórico dos Coronavírus

Primeiramente deve se ter uma clara distinção entre o nome do vírus e a doença causada por ele, pois é uma causa frequente de desentendimento e entre órgãos de jornalismo e divulgação científica. Para denominar a doença causada pelo SARS-CoV-2, a OMS introduziu o nome COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease-19*). O nome é bem inespecífico devido ao amplo espectro de manifestações clínicas causadas pelo SARS-CoV-2 que vão desde assintomáticas a severas, muitas vezes fatais. Por este motivo não se utiliza o nome SARS (sigla do inglês *Severe acute respiratory syndrome*) para caracterizar a infecção pelo SARS-CoV-2 pois a quantidade de dados clínicos e epidemiológicos coletadas, sugerem uma diferença dos dados reportados no surto da doença SARS em 2003 (CSG, 2020).

O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus humano descrito e pertence ao gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus*, relacionados à síndrome respiratória aguda. É o mesmo subgênero do vírus relacionado a um surto que ocorreu em 2003, o SARS-CoV e da mesma família do MERS-CoV que foi responsável por um surto em 2012 no oriente médio (Khalil, et.al., 2020). As características dos principais coronavírus que causaram grandes epidemias são listados na Figura 1.

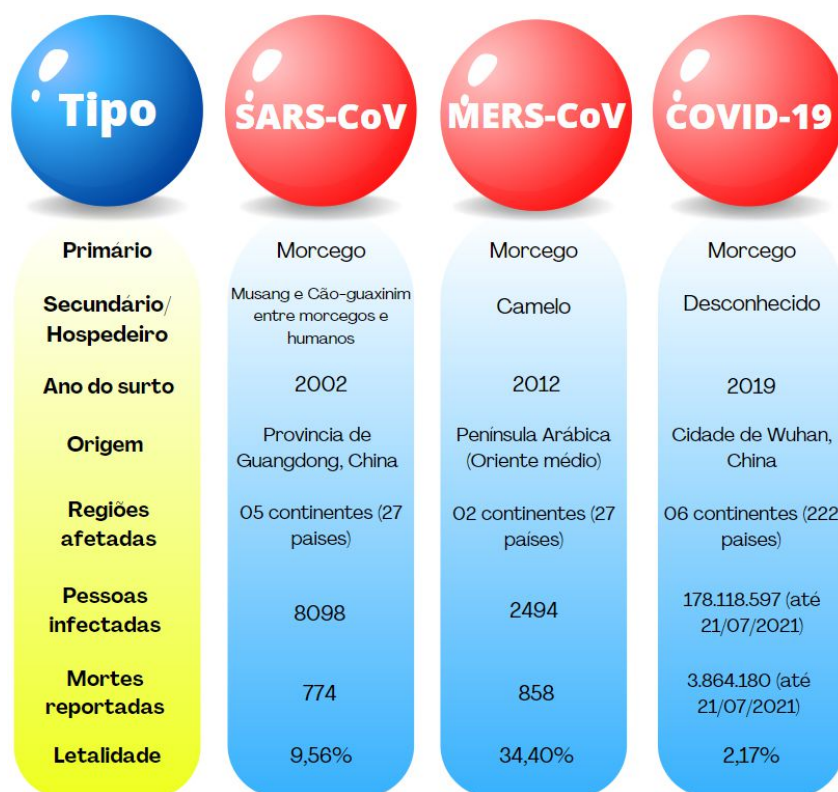


Figura 1: Análise comparativa de três surtos de coronavírus do século XXI incluindo SARS-CoV, MERS-CoV e COVID-19. A imagem indica os diferentes hospedeiros primários e secundários, os anos em que ocorreram os surtos e a origem dos coronavírus citados. Ainda são mostrados as regiões afetadas e as mortes reportadas, juntamente com a letalidade dos coronavírus humanos (SAMUDRALA et.al., 2020).

O SARS-CoV-1 foi o primeiro coronavírus de importância na saúde mundial, pois foi a causa da primeira pandemia por Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por Coronavírus (SARS-CoV) em março de 2003. O primeiro caso ocorreu em novembro de 2002 em Foshan, na China, espalhando-se por todo país até que em fevereiro de 2003 já haviam sido notificados mais de 300 casos, um terço dos quais em profissionais de saúde. O vírus foi identificado no início de abril do mesmo ano por uma rede de laboratórios estabelecida pela OMS, até que em julho de 2003 e após um total de 8.098 casos notificados, incluindo 774 mortes em 27 países, nenhuma outra infecção foi detectada e a pandemia de SARS foi declarada encerrada. Naquela época, já se sabia que vírus parecidos ao SARS-CoV, encontrados em morcegos, poderiam ressurgir devido à capacidade de infectar células humanas sem adaptação prévia (de WIT, et. al., 2016).

Após 10 anos do primeiro caso de SARS-CoV, em junho de 2012, um homem na Arábia Saudita morreu de pneumonia aguda e insuficiência renal, descobrindo-se um novo coronavírus, causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (em inglês MERS-CoV). A distribuição deste novo coronavírus se deu principalmente nos países do oriente médio, mas se espalharam para vários países, frequentemente relacionados à transmissão nosocomial. E três anos depois do primeiro caso registrado, um único indivíduo infectado retornando de viagem do oriente médio iniciou um surto de infecção nosocomial na Coreia do Sul que envolveu 16 hospitais e resultou em 186 pacientes infectados. É caracterizada por uma alta taxa de mortalidade, e até 2020 foram registrados 2494 casos e 858 mortes, cerca de 34% de mortalidade (de WIT, et. al., 2016).

No que diz respeito aos reservatórios do SARS-CoV, a primeira indicação da origem foi a detecção do vírus em musangs (ou civetas-de-palmeira-asiática) e um cachorro-guaxinim e a detecção de anticorpos contra o vírus em texugos-furões chineses em um mercado de animais vivos em Shenzhen, China. Mas percebeu-se que não havia evidência de circulação do vírus em musangs silvestres ou de criadouros, deduzindo que eles eram apenas hospedeiros acidentais. Na realidade os morcegos são os hospedeiros de uma ampla gama de coronavírus semelhantes ao SARS-CoV e ao MERS-CoV. Acredita-se que o SARS-CoV cruzou a barreira das espécies em animais da espécie musang em mercados de animais vivos na China e a análise genética sugere que isso ocorreu no final de 2002, fazendo com que o vírus surgisse por meio da recombinação de coronavírus relacionados à SARS de morcego. O vírus recombinado infectou civetas e humanos e se adaptou a esses hospedeiros antes de causar a epidemia de SARS. No caso do MERS-CoV estudos indicam que um vírus ancestral tenha cruzado a barreira de espécies entre morcegos e camelos dromedários há mais de 30 anos. A figura 2 exemplifica os diferentes reservatórios dos coronavírus que infectam humanos (CUI, et. al., 2018).

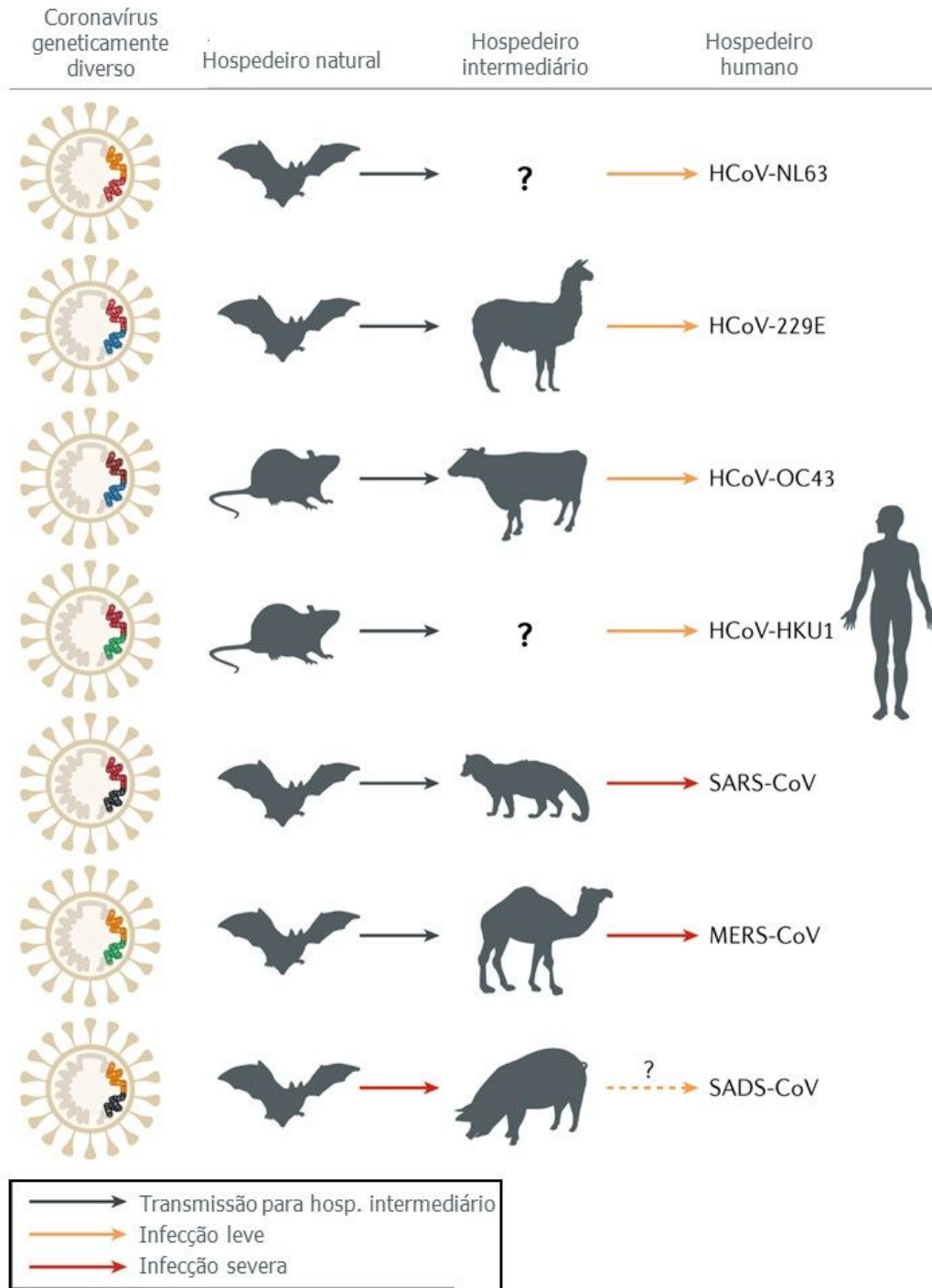


Figura 2: Origens animais dos coronavírus humanos. Os coronavírus possuem diferentes hospedeiros naturais e intermediários, as setas indicam o tipo de desfecho da infecção subsequente (CUI, et. al., 2018).

1.2 Constituição do SARS-CoV-2

Uma característica marcante dos coronavírus é a localização da proteína Spike (S) na membrana, o que ao se observar em um microscópio eletrônico de varredura confere à partícula uma forma semelhante a uma coroa ou halo. O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, sentido positivo e com um genoma grande, cerca de 30kb, o genoma é envelopado e é contido em um nucleocapsídeo helicoidal e no exterior da partícula estão inseridas as proteínas S que são mostradas na Figura 3. 2/3 do genoma do vírus SARS-CoV-2 codifica dois macropolipeptídeos (pp1a e pp1b) nas duas fases de leitura aberta ORF1a e ORF1b (Figura 3). Pp1a/pp1b são processados auto-proteoliticamente para gerar 16 proteínas não estruturais (NSP). O 1/3 restante do genoma do SARS-CoV-2 codifica as proteínas estruturais S (spike), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo) e vários ORFs; (3a, 6, 7a, 7b, 8, 9b e 10) (JAMISON, et. al., 2022). A proteína S é uma glicoproteína responsável por conferir à partícula de coronavírus a estrutura característica de coroa do vírus, ela se divide em duas subunidades chamadas de S1 e S2 e são importantes agentes que participam da entrada do coronavírus na célula. A alta infectividade do SARS-CoV-2 é devido a uma inserção de sítio de clivagem polibásica (furina) na junção das subunidades S1 e S2 da proteína S. Foi sugerido por estudos de análise computacional que esta inserção aumentaria a infectividade do SARS-CoV-2 em relação a outros betacoronavírus ao propiciar ao domínio de ligação ao receptor (RBD) uma ligação adequada ao receptor ACE2 humano e uma maior acessibilidade de proteases celulares que clivam a proteína S e permitem a liberação do genoma viral no citoplasma da célula (LI et. al., 2020; SAMUDRALA et. al., 2020).

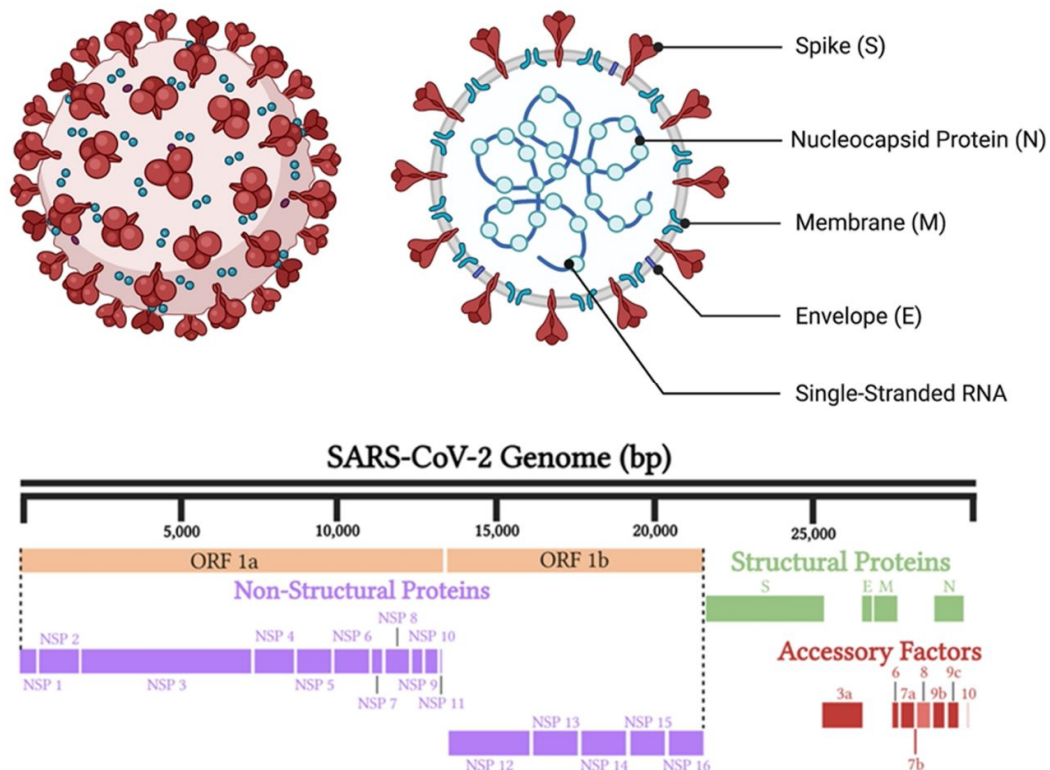


Figura 3: Elementos estruturais do vírus, incluindo a proteína spike (S), envelope (E), membrana (M) e componentes internos, como o RNA de fita simples viral e as proteínas do nucleocapsídeo (N), assim como os componentes do genoma SARS-CoV-2. O genoma de cerca de 30kb codifica dois macropolipeptídeos (Pp1a e pp1b), além das proteínas estruturais e fatores acessórios (JAMISON, et. al., 2022).

Quando se compara os diferentes coronavírus que infectam humanos, percebem-se diferenças fundamentais para a patogenicidade que é encontrada no novo Coronavírus. No caso da semelhança entre SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, todos são intimamente relacionados e possuem os mesmos reservatórios biológicos, mas as diferenças estruturais entre eles são impressionantes. O SARS-CoV-2 é marcadamente mais infeccioso, resultando em uma dinâmica epidemiológica muito diferente daquela do SARS-CoV e do MERS-CoV. Nestes dois últimos vírus, houve um aumento relativamente lento no número de casos, e o MERS-CoV nunca foi capaz de se adaptar totalmente à transmissão humana (ZHANG e HOLMES, 2020).

Para compreender melhor como o SARS-CoV-2 possui essa alta infectividade, foram necessárias análises genômicas comparativas entre diferentes tipos de coronavírus existentes e descobertos anteriormente. Nos primeiros casos registrados em Wuhan, a preocupação principal era identificar o vírus causador

da pneumonia aguda e o provável sítio de infecção, após o sequenciamento do genoma viral foi feita a comparação com o vírus causador da primeira pandemia do SARS-CoV. A análise comparativa revelou menos de 80% de semelhança na sequência de nucleotídeos entre as espécies SARS-CoV e SARS-CoV-2. Posteriormente, uma análise comparativa de um coronavírus de morcego (*BatCoV RaTG13*) revelou uma semelhança de 96% com o SARS-CoV-2 em relação a sequência de nucleotídeos (ZHOU et al., 2020).

Depois que foi determinado a provável origem do SARS-CoV-2, surgiu a necessidade de explicar a evolução do coronavírus, mas o que se tem ainda hoje são apenas hipóteses. Acredita-se que houve um período de infecção “críptica”, ou seja, inaparente em humanos antes da detecção deste vírus em 2019. Desta forma, talvez o vírus tenha surgido mais cedo em populações humanas. Isto porque neste período de infecção enigmática, infecções assintomáticas e sintomas inespecíficos, o vírus poderia ter adquirido gradualmente as mutações-chave, permitindo que se adaptasse totalmente aos humanos (ZHANG e HOLMES, 2020).

1.3 Epidemiologia, fatores de risco e manifestações clínicas

Segundo dados da OMS, até o dia 21 de março de 2023 houve 761.071.826 de casos confirmados e 6.879.677 de mortes registradas em todo o mundo. As regiões mais afetadas são as Américas, Europa e Sudeste da Ásia, e os países mais afetados são os Estados Unidos com 102.544.598 de casos, China com 99.229.372 de casos e Índia com 44.696.984 casos registrados (OMS, 2023).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o primeiro caso confirmado de COVID-19 foi em 26 de fevereiro de 2020, desde então até o dia 21 de março de 2023 foram notificados o total de 37.145.514 casos positivos para SARS-CoV2 e 699.634 mortes confirmadas, com uma incidência de 17.676 a cada 100 mil pessoas. A tabela 1 mostra a ocorrência da COVID-19 por região federativa no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Tabela 1 Ocorrência da COVID-19 por região federativa no Brasil até 21 de março de 2023 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Região	População	Casos Acumulados	Incidência (100mil)	Óbitos
Totais	210.147.125	37.145.514	17.676	699.634
Sudeste	88.371.433	14.770.757	16.714,4	336.679
Sul	29.975.984	7.879.080	26..284,6	110.672
Nordeste	57.071.654	7.320.694	12.827,2	134.740
Centro-Oeste	16.297.074	4.289.614	26.321,4	66.002
Norte	18.430.980	2.885.369	15.655	51.541

A COVID-19 apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas podendo ser assintomáticas, sintomas leves (gripais), moderados e até graves (cerca de 15% do total de casos). Os pacientes com sintomas graves muitas vezes precisam ser hospitalizados em UTI para garantir suporte respiratório e medicamentoso adequado, alguns evoluem para óbito. Alguns fatores de risco estão associados a pessoas que desenvolveram a forma grave da doença, eles principalmente são: pessoas com idade avançada, do sexo masculino, que apresentam hipertensão preexistente, diabetes, obesidade, tumores, imunodeficiências, mulheres na gravidez, tromboembolismo, distúrbios de coagulação e tabagismo. A relação da asma e alergias com a gravidade da COVID-19 ainda não é bem explicada e precisa ser investigada mais detalhadamente. As pessoas idosas e as que têm outras condições de saúde como pressão alta, problemas cardíacos e do pulmão, diabetes ou câncer, têm maior risco de ficarem gravemente doentes. No entanto, qualquer pessoa pode pegar a COVID-19 e ficar gravemente doente (GARCIA, 2020; GAO et. al., 2021; OPAS, 2020).

1.4 Diagnóstico e vacina

O diagnóstico da COVID-19 deve ser rápido, no sentido de identificar indivíduos infectados e iniciar as profilaxias como o isolamento domiciliar e evitar novos contágios. Atualmente a metodologia preferida de testes para detectar o SARS-CoV-2 é o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e as versões de tempo real

são as mais avançadas que se tem hoje. Testes laboratoriais e de imagem também são importantes para avaliar a gravidade da COVID-19 no paciente, devido aos sintomas inespecíficos. Os exames laboratoriais podem apresentar leucocitose, linfopenia, eosinopenia, níveis séricos elevados de Dímero-D, HDL, AST e ALT, creatinina, ferritina entre outros (VANDENBERG et. al., 2020; GAO et. al., 2021).

Segundo a OMS, até 05 de março de 2021 havia 79 vacinas para COVID-19 com desenvolvimentos clínicos em andamento, sendo que 12 já estão na fase III e 4 na fase IV. Os imunógenos que estão sendo utilizados para desenvolver vacinas para COVID-19 são de quatro tipos: Vírus inativado, Subunidade viral, Vetor viral e Vacinas de RNA. A escolha sobre qual tipo de vacina a ser administrada depende do tempo de desenvolvimento, custos, tempo de produção e o acesso às vacinas. Até 29 de março de 2023, 13.34 bilhões de doses de vacina foram aplicadas em todo o mundo, segundo a *Our World In Data*, e pelo menos 69,8% da população vacinada com pelo menos uma dose. No Brasil até 27 de janeiro de 2023, já foram aplicadas 547.460.755 de doses de vacina, com cerca de 85,05% da população adulta vacinada com pelo menos a primeira dose, e 80,56% da população totalmente imunizada (OMS, 2021; OUR WORLD IN DATA, 2023; G1, 2023).

1.5 Resposta imune da infecção pelo SARS-CoV-2

Dentre os sintomas da COVID-19, o acometimento pulmonar é o principal relacionado a mortalidade dos pacientes acometidos. O principal alvo do SARS-CoV-2 são células pulmonares e o desenvolvimento da doença depende da resposta imune ao vírus, quando em pacientes graves é exacerbada, aumenta-se muito a chance de dano irreversível ao pulmão e, logo, óbito do paciente.

A proteína *spike* do SARS-CoV-2 é reconhecida pelo receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2), presente principalmente nas células epiteliais respiratórias. Após a replicação viral dentro das células, o vírus é liberado via exocitose e se espalha de forma rápida no epitélio bronco alveolar, rapidamente atraindo várias células imunológicas para o local da infecção e

promovendo um forte ambiente pró-inflamatório e uma localização ideal para hipersecreção de muco. A infecção por SARS-CoV-2 induz a super expressão de mucinas, promovendo ainda mais o agravamento da doença. Como as mucinas são componentes críticos da imunidade inata, desvendar seus perfis de expressão que ditam o curso da doença poderia melhorar muito nossa compreensão e manejo do COVID-19. Na verdade, um breve estudo que abrange aspecto da mucina sanguínea parece discriminar COVID-19 sintomático de pacientes sem doença com base na expressão de MUC1, MUC2, MUC4, MUC6, MUC13, MUC16 e MUC20 (SMET et al., 2021).

(Complicações da covid 19) A imunopatogênese da COVID-19 em casos agudos se dá muitas vezes pela chamada tempestade de citocinas, que gera um ambiente de hiperinflamação com aumento de monócitos e macrófagos e redução de linfócitos. A tempestade de citocinas é causada pelo aumento de macrófagos derivados de monócitos no tecido pulmonar, sendo que estes macrófagos ativados são potentes produtores de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como por exemplo IL-12 e TNF. Adicionalmente, macrófagos ainda expressam receptores ACE-2 em sua superfície, podendo ser potencial alvo do vírus e de geração de nova progênie viral. Os monócitos envolvidos na resposta imune ao SARS-CoV-2 podem gerar um agravamento da doença devido a uma alteração morfológica e expressão fenotípica relacionada à inflamação. A hiperativação de células com alta produção de citocinas pró inflamatórias pode levar ao desenvolvimento de uma patogenia, gerando um alto sinal de IFN- γ e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Os monócitos então respondem a este estímulo, se diferenciando e uma vez ativados, são convertidos em subpopulações de monócitos inflamatórios CD14⁺ CD16⁺ em pacientes infectados. Esses monócitos atípicos podem entrar na circulação pulmonar e são capazes de secretar altos níveis de GM-CSF e IL-6 para induzir ainda mais a migração de monócitos e mediar a infiltração de macrófagos inflamatórios e células dendríticas, levando a lesões pulmonares graves. A Figura 4 exemplifica este processo (ZHANG, et. al., 2020).

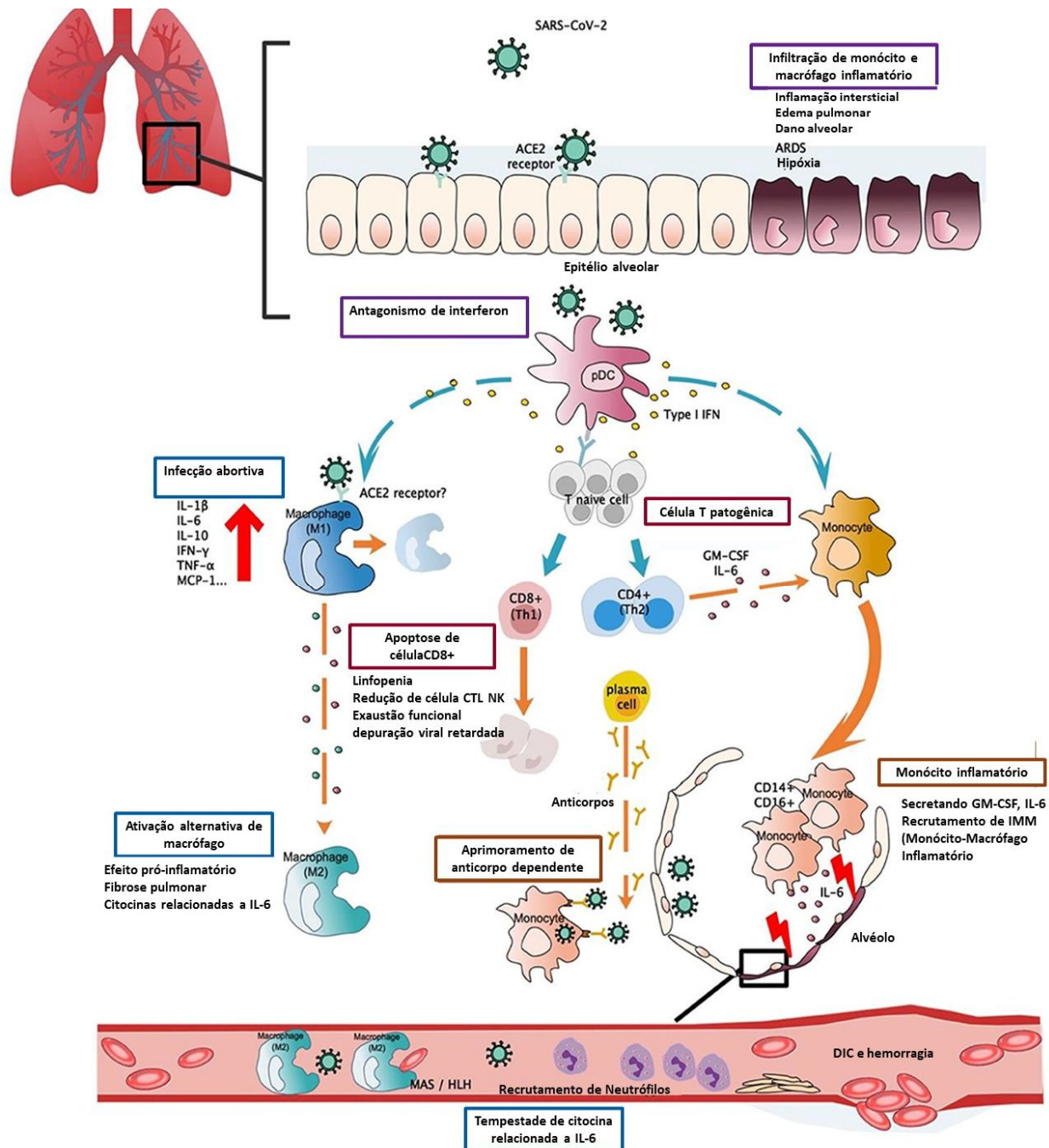


Figura 4: Esquema da imunopatogênese da infecção por SARS-CoV-2. A figura ilustra várias estratégias e eventos deletérios envolvidos na patogênese do SARS-CoV-2, juntamente com suas consequências patológicas. A entrada viral inicial ocorre nos alvéolos epiteliais, onde o vírus se liga ao ACE2 através da proteína S. (ZHANG, et al., 2020).

Alguns estudos estão começando a buscar explicações para a ocorrência desta tempestade de citocinas. Por meio do estudo de polimorfismos chave em genes de citocinas e quimiocinas que ocorrem em diferentes tipos de doenças

respiratórias, pesquisadores estão conseguindo associar os achados nestes estudos com a progressão da COVID-19, isto porque estes polimorfismos são descritos como associados a diferentes condições patogênicas e com uma forte correlação entre a gravidade das respostas imunes em pacientes afetados. Como dito anteriormente, a hiperativação de células é que desregula a resposta imune e causa a resposta exacerbada dos leucócitos, o papel do polimorfismo pode explicar a hiperativação. Mutações não silenciosas nas regiões codificantes podem resultar na perda, alteração funcional ou super expressão das citocinas, assim, o polimorfismo pode interferir na sua expressão através de modificações pós-transcricionais, ao nível da transcrição e alterando a estabilidade do mRNA, pode, portanto, inibir ou super estimular a expressão do gene (PAIM, et. al., 2021).

É possível então perceber que a elevada produção de citocinas durante a fase aguda pode gerar um agravamento do curso clínico da doença e resultar em uma inflamação sistêmica, fazendo com que a tempestade de citocinas exerça um papel patogênico em vez de protetor no hospedeiro, mas também se torna um importante alvo para desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

1.6 Tratamento da COVID-19

(tópico de reposicionamento) Existem estudos de diversos agentes antivirais e anti-inflamatórios para o tratamento da COVID-19, alguns inclusive já aprovados para uso em humanos e com resultados promissores. O tratamento paliativo dos sintomas leves é realizado como uma gripe convencional com a hidratação do paciente e medicamentos para tratar dor e febre. No entanto, o tratamento da síndrome respiratória aguda grave associada ao vírus requer mais cuidados com intervenção farmacológica via corticosteroides, muitas vezes associado tratamento mais utilizado para casos graves que envolve a intubação para indução de respiração mecânica e profilaxia para trombose com uso de heparinas de baixo peso molecular. Alternativamente para tentar reduzir a carga viral do paciente são utilizados agentes antivirais, plasma e imunoglobulinas recombinantes anti-spike (STASI et. al., 2020, ABDELRAHMAN, et. al., 2021, ZHOU, et. al., 2021).

Entre as principais estratégias de tratamento utilizando fármacos estão: antivirais, corticosteroides, imunoglobulinas e imunomoduladores como antagonistas de IL-6. No entanto, o custo de vários destes medicamentos, com exceção dos corticoides foi muitas vezes um grande impeditivo no tratamento da COVID-19 (ZHOU, et. al., 2021, ABDELRAHMAN, et. al., 2021).

A Imagem 5 mostra os principais alvos dos fármacos que foram estudados para o tratamento da COVID-19, correlacionando com as etapas da replicação viral e a resposta do hospedeiro.

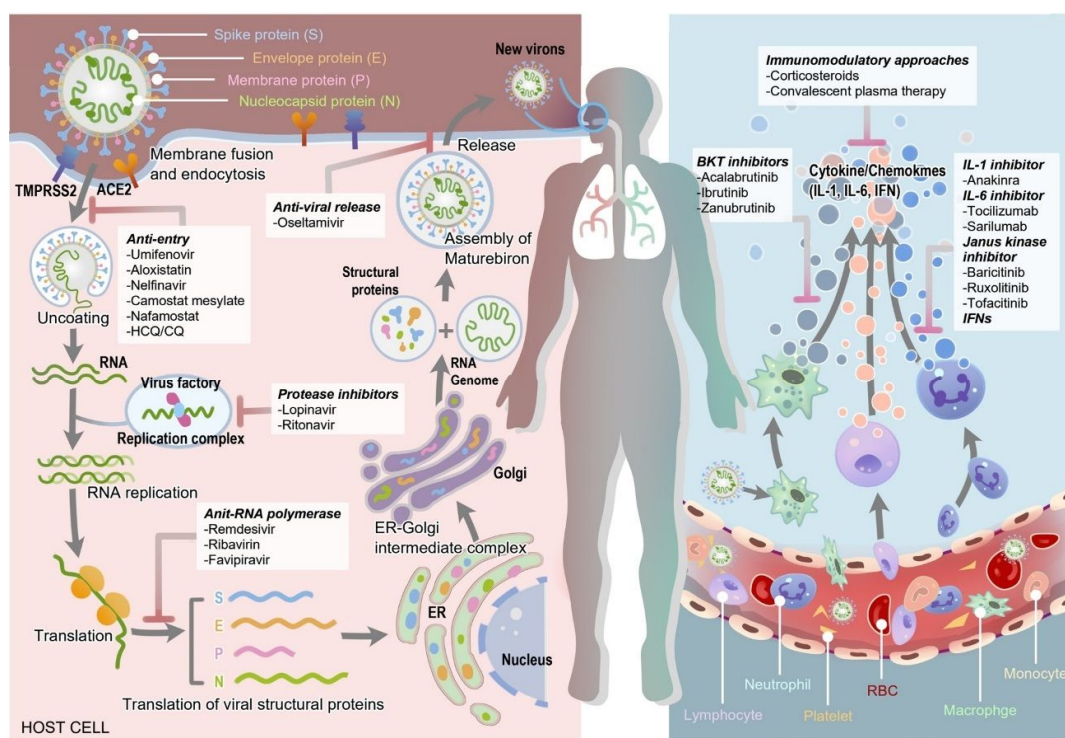


Figura 5: Visão geral dos principais compostos estudados para tratamento da COVID-19 e sítios de ação. A patogênese do COVID-19 possui dois cursos: a infecção precoce envolve a replicação viral, enquanto a infecção tardia leva a danos nos tecidos devido à resposta inflamatória excessiva. Tanto as proteínas virais quanto os fatores do hospedeiro são importantes para a patogênese da COVID-19 e alvos potenciais para a terapia antiviral (ZHOU, et. al., 2021).

Como mencionado no tópico da resposta imune ao SARS-CoV-2, a COVID-19 grave é causada pela intensa resposta do hospedeiro associada às interações vírus-hospedeiro. Por este motivo o estudo dos compostos que são utilizados

para o tratamento vai ser de acordo com estes mecanismos de replicação viral e resposta imune. Dito isto, os mecanismos de ação podem ser vírus-específicos ou hospedeiro-específico.

1.6.1 Mecanismos de ação: Vírus-específico

Dentre as principais estratégias, os fármacos antivirais são os que estão com estudos mais avançados para aprovação. Um medicamento antiviral é o que vai agir em um determinado componente ou etapa do ciclo de replicação da partícula viral e, portanto, impedindo-o de agir nas células do hospedeiro. Os principais antivirais estudados contra o SARS-CoV-2 são fármacos que já foram utilizados antes em humanos em surtos de outros vírus que ocorreram anteriormente e tem eficácia comprovada, mas visto que a COVID-19 é uma doença relativamente nova é necessário entender os mecanismos da replicação viral.

A penetração na célula do hospedeiro é a primeira etapa de infecção viral do SARS-CoV-2. Para isto, as proteínas estruturais são muito importantes neste processo, as proteínas S, N, M e E são as principais. Por este motivo, estratégias terapêuticas vão ser projetadas para impossibilitar a entrada viral ao ter como alvo elementos chave das proteínas estruturais. Alguns medicamentos que já possuíam este mesmo mecanismo “anti-entrada” foram reposicionados para o estudo como terapia à infecção pelo SARS-CoV-2, como o umifenovir e hidroxicloroquina. Porém, estes compostos estudados para inibir a penetração do vírus nas células do hospedeiro não demonstraram resultados clínicos significativos e não são uma preferência para o tratamento. Os principais medicamentos estudados para inibir a penetração do vírus são listados na Figura 5 (ZHOU, et. al., 2021).

Outro alvo muito interessante para o desenvolvimento de fármacos é a replicação do genoma viral e proteólise da poliproteína viral. Neste sentido, proteínas não estruturais desempenham um papel importante neste processo, isto porque aproximadamente 67% do genoma do SARS-CoV-2 codifica duas poliproteínas: poliproteína 1a (pp1a) e poliproteína 1 ab (pp1ab). Essas proteínas são degradadas em 16 Nsps que são essenciais para multiplicação viral. Os

mecanismos neste caso são a inibição da RNA polimerase e os inibidores da protease. Os principais fármacos utilizados em estudos contra a replicação viral são o Remdesivir, Ribavarina, Lopinavir e mais recentemente o Molnupiravir e o Paxlovid. Ribavirina e lopinavir não foram eficazes na inibição da RNA polimerase do SARS-CoV-2 (ZHOU, et. al., 2021).

E por último, a liberação viral também é uma etapa importante da viremia da COVID-19, sendo o Oseltamivir o medicamento estudado para inibir esta etapa. A liberação viral pode ocorrer de três maneiras: lise da célula hospedeira, brotamento ou exocitose. O Oseltamivir se liga à bolsa hidrofóbica do sítio ativo da neuraminidase viral, prejudicando a capacidade dela de clivar resíduos de ácido siálico na superfície das células infectadas e inibindo assim a liberação do vírion por meio do brotamento. Porém, mais de 178 ensaios clínicos já foram registrados com o oseltamivir e nenhum foi marcado como completo ou com resultados comprovando eficácia deste antiviral, tornando-o menos aplicável para o tratamento da COVID-19 (ZHOU, et. al., 2021).

1.6.2 Principais antivirais em uso contra SARS-CoV-2

O Remdesivir pertencente à classe dos análogos de nucleotídeos, tem como alvo a polimerase de RNA dependente de RNA do SARS-CoV-2 (RdRp), que medeia a replicação e a transcrição do genoma do coronavírus. Já utilizado anteriormente na epidemia do vírus Ebola na África e atualmente é reposicionado para tratamento da COVID-19 moderado e grave. O Remdesivir mostrou resultados significativos na redução do tempo de hospitalização dos pacientes, sugerindo o início do tratamento com remdesivir precocemente, antes da progressão da doença pulmonar com necessidade de ventilação mecânica, portanto sendo o único antiviral aprovado clinicamente para o tratamento da COVID-19 (STASI, et. al., 2020). No entanto, o alto custo deste medicamento e sua síntese complexa se tornam grandes impeditivos do seu uso em ampla população.

Em 1º de outubro de 2021, a *Merck* e a *Ridgeback Biotherapeutics* anunciaram seu antiviral o Molnupiravir, um antiviral de amplo espectro que já está na fase

avançada dos ensaios clínicos e recentemente aprovado no Reino Unido para tratamento da COVID-19 em novembro de 2021. O medicamento semelhante ao Remdesivir, tem o mesmo alvo (RdRp) e é proposto para inibir a replicação viral por um mecanismo conhecido como 'mutagênese letal' como visto na figura 7. Estudos revelam que o Molnupiravir foi capaz de interromper a fidelidade da replicação do genoma do SARS-CoV-2 e previne a propagação viral ao promover o acúmulo de erros em um processo conhecido como 'catástrofe de erros'. É nesta característica que o Molnupiravir se distingue do Remdesivir, pois após as mutações nos nucleotídeos do RNA de replicação do SARS-CoV-2, o RNA é forçado a uma mutação acima do limite de erro que demarca a fidelidade de replicação necessária para viabilidade (MALONE e CAMPBELL, 2021).

O que temos de mais recente quando se trata de medicamentos antivirais é um novo composto desenvolvido pela Pfizer, o Paxlovid que apresentou resultados muito promissores. Apenas 3 das 389 pessoas que receberam o medicamento foram hospitalizadas, em comparação com 27 de 385 que receberam o placebo e enquanto não houve morte no grupo que recebeu o medicamento, 10 pessoas do grupo placebo morreram. Com os resultados preliminares disponibilizados pela Pfizer é possível já ter uma ideia de como funciona o mecanismo de ação da droga. O Paxlovid é uma combinação de um inibidor da protease, o PF-07321332 e um consagrado antiviral para HIV, o ritonavir. O PF-07321332 foi projetado para bloquear a atividade da protease SARS-CoV-2-3CL, uma enzima que o coronavírus precisa para se replicar, visto na Figura 7. A coadministração com uma dose baixa de ritonavir ajuda a desacelerar o metabolismo ou a quebra do PF-07321332 para que permaneça ativo no corpo por períodos mais longos em concentrações mais altas para ajudar a combater o vírus. Por este mecanismo de ação ser diferente do molnupiravir, podemos ter em mãos uma nova estratégia para o combate de uma possível resistência ou surgimento de novas variantes (COUZIN-FRANKEL, 2021; PFIZER, 2021).

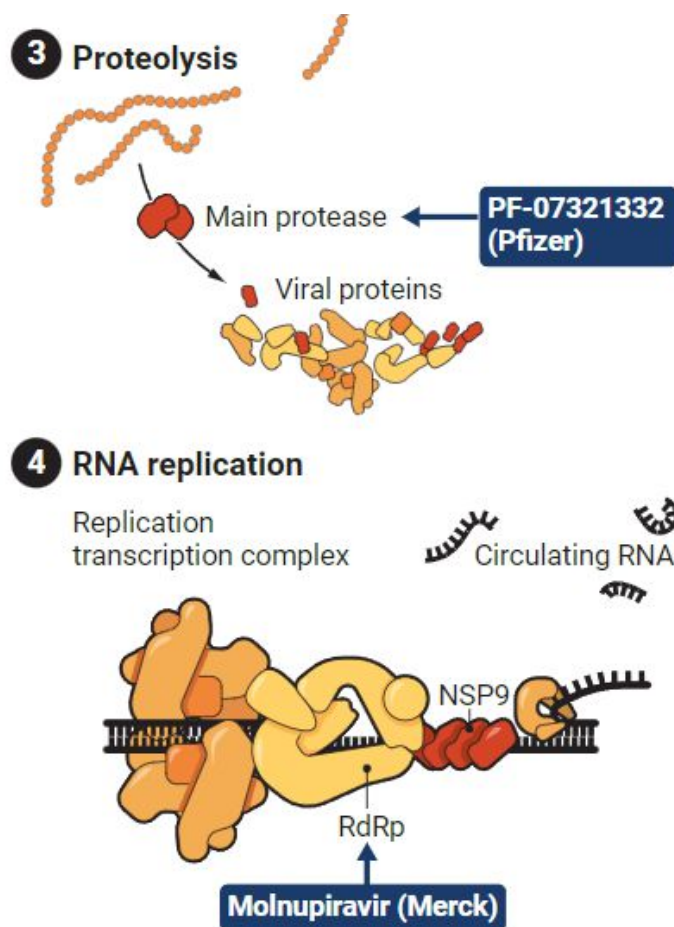


Figura 6: Sítio de ação do PF-07321332 e do molnupiravir. O composto da Pfizer possui atuação na principal protease do SARS-CoV-2 (mPro) enquanto o Molnupiravir da Merck, inibe a replicação do RNA viral ao inibir a enzima RdRp (COUZIN-FRANKEL, 2021).

1.6.3 Principais moduladores da inflamação para o tratamento da COVID-19

A terapia com interferons (IFN) do tipo I, uma família de citocinas antivirais que tem papel chave no contexto da resposta imune ao SARS-CoV-2. Os interferons (IFN) do tipo I é um grupo de moléculas regulado por cartesiana um sistema complexo de histonas, controlando a infecção viral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O uso de IFNs associados a antivirais como o lopinavir/ritonavir foi preferível ao antiviral sozinho em resultados de PCR negativos, aliviando assim os sintomas clínicos e encurtando a permanência hospitalar em pacientes com COVID-19 leve a moderado. Por outro lado, os IFNs têm eventos adversos óbvios, incluindo sintomas semelhantes aos da gripe, dores de cabeça, reações gastrointestinais

e erupções cutâneas. Assim, seu uso até esta data não rendeu dados suficientes para avaliar os benefícios potenciais e riscos de toxicidade dos IFNs (ZHOU, et. al., 2021).

Alguns corticosteroides podem diminuir a gravidade da tempestade de citocinas e reduzir a mortalidade de pacientes com infecção por SARS-CoV-2, a dexametasona é uma das drogas representativas dos corticosteroides e é usada principalmente em doenças inflamatórias alérgicas e autoimunes. A dexametasona está na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde e estão prontamente disponíveis em todo o mundo a baixo custo. Estudos recentes fornecem evidências de que o tratamento com dexametasona na dose de 6 mg uma vez ao dia por até 10 dias reduz a mortalidade em 28 dias em pacientes com COVID-19 que estão recebendo suporte respiratório (RECOVERY, 2021).

Um dos novos tratamentos anti-inflamatórios que foi utilizado é o composto colchicina. É um composto já aprovado para uso em humanos pela *Food and Drug Administration* do EUA desde 2009, mas registros que datam a mais de 1500 dC descrevem o uso da planta fonte para tratamento de dor e inflamação. Atualmente a colchicina está aprovada para o tratamento e prevenção da gota aguda e da febre familiar do Mediterrâneo, e é usada alternativamente na doença de Behçet, pericardite e outras condições inflamatórias. O mecanismo de ação da colchicina no inflamassoma permanece ainda em estudo, mas recentemente foi demonstrado que ela diminui a produção de citocinas ao inibir a ativação do inflamassoma NLRP3, a interrupção deste sistema pela droga reduz a produção de IL-1 β e que por sua vez impede a indução do IL-6 e TNF e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos adicionais. A colchicina deve ser administrada no início dos sintomas antes da COVID-19 evoluir para forma grave, sendo uma boa alternativa de profilaxia e por ser barata e fácil de administrar é uma boa opção para países em desenvolvimento que ainda têm dificuldades em manter a hospitalização de pacientes (REYES, et. al., 2020).

No contexto dos estudos pré-clínicos, a N-acetilcisteína (NAC) tem sido considerada no contexto de doenças respiratórias devido sua capacidade

mucolítica. NAC é um medicamento seguro e barato disponível comercialmente desde 1960. O único uso aprovado para a NAC é de antídoto para envenenamento por paracetamol, mas já existem vários estudos indicando a atividade antioxidante do NAC, que pode ser atribuída a três mecanismos: atividade antioxidante direta, indireta ou quebra de ligações dissulfídicas. O que chamou a atenção do NAC para tratamento da COVID-19 foi a capacidade de reduzir a ativação do sistema imune e diminuir a tempestade de citocinas. Estudos anteriores mostram que a adição de NAC ao protocolo de tratamento padrão e uso pediátrico diminui a gravidade de muitas condições respiratórias agudas, como influenza, pneumonia adquirida na comunidade, SRAG, pneumonia associada à ventilação, principalmente por atenuar a ativação imunológica. Em todos os estudos, a dose diária de NAC, 1200 mg, demonstrou ser bem tolerada sem qualquer reação adversa significativa (MOHANTY, et. al., 2021).

1.7 BromAc®

Desenvolvido por pesquisadores do grupo MucPharm, BromAc® é uma combinação de dois medicamentos e foi desenvolvida para o tratamento paliativo de uma condição rara de tumor mucinoso do apêndice chamada de pseudomixoma peritoneal. O BromAc® em combinação foi capaz de remover a estrutura proveniente da expressão das mucinas MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC e MUC16, e removendo ligações glicosídicas e pontes dissulfeto provenientes do câncer produtor de mucina (MUCPHARM PTY LTD, 2020).

A hipótese de que o BromAc® poderia ser eficaz contra o SARS-CoV-2 surgiu após estudar o que já se conhecia da Bromelina e da Acetilcisteína como agentes antivirais. A Bromelina é conhecida por remover a proteína Spike e hemaglutinina de vírus semelhantes aos coronavírus, tornando-os incapaz de entrar na célula hospedeira. Já a Acetilcisteína também utilizada como medicamento antiviral para Influenza A e B, inibindo a replicação viral, promovendo produção de algumas citocinas pró-inflamatórias e inibindo outras que são associadas a tempestade de citocinas como a MUC5, IL-6 e TNF α , que torna o BromAc® uma estratégia atrativa para promover uma atividade antiviral local. In vitro, ela sinergicamente inibiu a infecciosidade de duas cepas do SARS-CoV-2 cultivados

em células Vero, mostrando um potencial efeito antiviral. O pré-tratamento com BromAc® pode ser correlacionado com a redução das ligações dissulfureto pela glicoproteína N-acetilcisteína, e é potencializada pela combinação com a bromelina. Acredita-se que esta combinação possa promover um efeito mucolítico e anti-inflamatório quando utilizada para o tratamento da COVID-19. (MUCPHARM PTY LTD, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

A COVID-19 é uma doença causada por um novo coronavírus, o SARS-CoV-2 e tem mobilizado a sociedade nestes últimos dois anos. Milhares de vidas foram ceifadas pela doença que é letal para os grupos de risco. Alguns pacientes podem apresentar dores, congestão nasal, dor de cabeça, conjuntivite, dor de garganta, diarreia, perda de paladar ou olfato, erupção cutânea na pele ou descoloração dos dedos das mãos ou dos pés. Esses sintomas geralmente são leves e começam gradualmente. Algumas pessoas são infectadas, mas apresentam apenas sintomas muito leves. Apesar de maioria das pessoas (cerca de 80%) se recupera da doença sem precisar de tratamento hospitalar, uma em cada seis pessoas infectadas por COVID-19 fica gravemente doente e desenvolve dificuldade de respirar. As pessoas idosas e as que têm outras condições de saúde como pressão alta, problemas cardíacos e do pulmão, diabetes ou câncer, têm maior risco de ficarem gravemente doentes. No entanto, qualquer pessoa pode pegar a COVID-19 e ficar gravemente doente. Embora a vacina tenha reduzido os casos graves da doença, a possibilidade de existirem variantes do SARS-CoV-2 recomendam cautela em relação ao recrudescimento da doença.

Devido à variada sintomatologia e ao grande número de infecções e mortes ocasionadas pela COVID-19, é de extrema importância pesquisar sobre novas formas de conter o avanço da doença, uma vez que a profilaxia esteja consolidada com o uso de máscara de proteção e distanciamento social, ainda é preciso uma nova ferramenta para ajudar no controle dos casos. Atualmente, existem tratamentos eficazes para reduzir a intensidade da forma grave da COVID-19, sendo o tratamento feito com dexametasona e ventilação mecânica. Não existe ainda medicamentos inalatórios que atuem nas vias aéreas para o tratamento dos pacientes com COVID-19. Uma droga com capacidade mucolítica e anti-inflamatória pode ser um grande aliado no controle da pandemia. Sendo assim houve várias tentativas falhas de desenvolvimento de produzir um medicamento seguro e eficiente, com ação específica para terapia anti-inflamatória. Mais importante, estudos focando em drogas que são

administradas de forma intranasal para agir mais rapidamente nas vias aéreas ainda são escassas.

Quando se trata de casos graves de COVID-19, a respiração mecânica é uma das poucas alternativas de tratamento do sintoma da SRAG de pacientes infectados. Uma das características dessa fase é a agregação e acúmulo de muco no pulmão do paciente, o que leva a uma dificuldade maior na respiração e promove ainda mais a infecção no trato respiratório. Utilizando-se de uma droga que fosse ao mesmo tempo mucossolvente, antiviral e anti-inflamatória pode-se conseguir um tratamento adequado para a sintomatologia da COVID-19.

3. OBJETIVO GERAL

Examinar o efeito mucolítico e anti-inflamatório do BromAc® em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar aspectos reométricos de amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 após tratamento com BromAc® e N-acetilcisteína para aferir sua atividade mucolítica;
- Avaliar o perfil de quimiocinas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 após tratamento com BromAc® e N-acetilcisteína;
- Avaliar o perfil de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 após tratamento com BromAc® e N-acetilcisteína;
- Avaliar o perfil de fatores de crescimento em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 após tratamento com BromAc® e N-acetilcisteína;
- Avaliar o impacto do BromAc® frente ao estímulo com SARS-CoV-2 in vitro em células provenientes do sangue periférico (produção dos biomarcadores).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 BromAc®

Para as preparações, 100mg de Bromelina estéril liofilizada (*Mucpharm Pty Ltd*) foi ressuspensa em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e alíquotas armazenadas a -20°C. A N-acetilcisteína (NAC) a 200mg/mL, formato injetável, foi mantida em temperatura ambiente até o uso.

4.2 Amostras de Pacientes

As amostras de aspirado traqueal (AT) (1 a 10mL) foram coletadas durante a rotina matinal de pacientes com COVID-19, com idade entre 18 e 80 anos, em ventilação mecânica no Centro de Terapia Intensiva (CTI) ou nas enfermarias do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN) da UFMG. Todos os pacientes incluídos no estudo testaram positivo para SARS-CoV-2 por RT-PCR direcionado para o gene E. Apenas pacientes produtivos de secreção foram incluídos no estudo, um total de 15. As amostras foram aspiradas para coletores de secreção traqueal estéreis e imediatamente processadas em laboratório de nível 3 de biossegurança. As amostras de aspirado traqueal foram tratadas com a combinação de Bromelina em concentrações de 125µg e 250µg e NAC 2% (20mg/mL) (BromAc®) e incubadas a 37°C. Após a incubação, foram realizados ensaios de fluxo, medidas reométricas e avaliação da tempestade de citocinas. Os parentes mais próximos do participante foram consultados e assinaram o consentimento informado por escrito em seu nome para participar da investigação. Para os ensaios de cultura de curta duração, foram utilizadas amostras de sangue de 9 pacientes saudáveis. Este estudo seguiu os princípios da declaração de Helsinque, bem como a resolução nº 466/2012 do Ministério da Saúde do Brasil para pesquisas envolvendo seres humanos e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (CAAE number: 45919121.6.0000.5526).

4.3 Ensaio de fluxo direto

Para avaliar o impacto do BromAc® e seu efeito mucolítico na viscosidade das amostras de aspirado traqueal (AT) de 15 pacientes com COVID-19, as amostras de AT foram tratadas com 125 a 250 µg de Bromelina e 2% de NAC (BromAc®) usando um dispositivo de atomização da mucosa (MAD nasal) (Teleflex®) e incubado a 37°C em placas de 6 poços. Após a incubação e avaliação visual das amostras de AT, o tempo de mucólise foi avaliado. Em seguida, as amostras de AT tratadas foram passadas por filtros de células (70µm) colocados em tubos de polipropileno Falcon de 50ml. As amostras foram pipetadas em filtros de células e o fluxo de volume foi coletado e medido. A pipetagem picada e repetida foi estritamente evitada para medir o fluxo com precisão. O volume do fluxo foi colhido, aliquotado e armazenado a -80°C. A análise de celularidade das amostras de aspirado traqueal foi feita utilizando o contador automático *Countess 3 (Thermo Fisher Scientific Inc.)*, com a coloração de azul de tripan, seguindo orientações do fabricante.

4.4 Medidas reométricas

A reometria também foi utilizada para avaliar a viscosidade e a tensão de cisalhamento promovidas pelo tratamento com BromAc®. A avaliação do perfil reológico das amostras do aspirado traqueal de 15 pacientes foi realizada em um viscosímetro rotacional Brookfield®, modelo DV III (*Ametek Brookfield, Middleborough, EUA*). A análise foi realizada usando três grupos de amostra: controle (sem tratamento), NAC (tratado com N-acetilcisteína), BromAc® 125 (tratado com Bromelina a 125 µg e NAC 2%) e BromAc® 250 (tratado com Bromelina a 250 µg e NAC 2%). Após a preparação e adição dos princípios ativos realizada anteriormente, todas as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto e colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 1 ml de cada amostra foi colocado no copo de amostragem do viscosímetro rotacional e a leitura foi obtida no fuso CP52. O equipamento foi controlado por meio do software Rheocalc® V3.3 (*Ametek Brookfield, Middleborough, EUA*) programado

para variar a velocidade do fuso de 0,01 a 250 RPM, com avaliação de 30 pontos entre esses valores e tempo de equilíbrio de 30 segundos a cada nova velocidade. Dados de viscosidade (cP), torque (%) e tensão de cisalhamento (D / cm²) foram coletados, e os resultados foram apresentados em termos de taxa de cisalhamento (seg-1).

4.5 Avaliação de mediadores inflamatórios imunológicos em amostras de aspirado traqueal de pacientes COVID-19 por Luminex

Para verificar o efeito do BromAc® nos mediadores inflamatórios presentes nas amostras de aspirado traqueal (AT) de pacientes com COVID-19, as amostras de AT foram tratadas com 125 a 250 µg de Bromelina e 2% de NAC (BromAc®) conforme descrito anteriormente. As amostras tratadas e não tratadas de AT foram incubadas a 37⁰C em placas de 6 poços por 1 hora. Depois disso, as alíquotas dos espécimes de AT foram inicialmente limpas por centrifugação a 800 x g por 10 min, em temperatura ambiente e os sobrenadantes de AT foram transferidos para microtubos de 2ml frescos. As amostras foram diluídas 1:10 e incubadas com esferas magnéticas cobertas com anticorpos monoclonais específicos para vários mediadores imunológicos, tais como: quimiocinas (CXCL8, CCL3 e CXCL10), citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-α IL- 6, TNF-α, TNF-β, IFN-γ, IFN-α, IL-15, IL-18 e IL-17a), citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-22) e fatores de crescimento GM-CSF, IL-2 e IL-7). Os experimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante usando o ensaio *Procarta Human Cytokine 34-plex*, (*Invitrogen*, CA, EUA) e o ensaio *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Assay* (*Bio-Rad*, CA, EUA). Os mediadores imunológicos foram medidos em amostras de AT e as concentrações de cada amostra foram determinadas de acordo com as curvas padrão executadas para cada molécula testada usando uma análise de ajuste logístico de quinto parâmetro. Os resultados foram expressos em pg/mL para todos os mediadores testados.

4.6 Avaliação do perfil anti-inflamatório de BromAc® frente ao estímulo de células provenientes do sangue periférico com SARS-CoV-2 in vitro.

Inicialmente, hemogramas foram realizados com as amostras coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e, a partir da contagem global de leucócitos foram realizados os cálculos para os ajustes necessários à obtenção de preparações celulares com 1×10^7 leucócitos/mL. Em seguida, o sangue coletado em tubos contendo heparina sódica foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 50mL e centrifugado a 660 x g, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi retirado e quantidade equivalente de meio RPMI 1640 (GIBCO – *Grand Island*, NY) foi adicionado e a suspensão celular foi homogeneizada e centrifugada a 660x g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido e a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 leucócitos/mL.

Após o ajuste, a suspensão celular foi transferida para tubos de polipropileno de 14mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, E.U.A.) e incubados por uma hora sob agitação constante em estufa a 37°C e 5% de CO₂, na ausência e na presença de BromAc® 250 microgramas. Após incubação, foram adicionadas às culturas, estímulo com SARS-CoV-2 inativado (500pfu) e as culturas foram incubadas nas mesmas condições mencionadas, por 30 minutos. A quantidade de vírus em pfu a ser adicionada foi testada em três culturas de curta duração com células do sangue periférico, foram testadas 500pfu, 1000pfu e 1500pfu, os resultados não são mostrados, mas o estímulo viral com 500pfu foi o que houve maior viabilidade celular. Também, foram realizadas culturas controle (CC) na ausência do vírus e um controle com apenas BromAc® sem vírus. Como controle de funcionalidade (controle positivo) para o estudo de ativação das células e investigação de citocinas intracelulares, foram realizadas culturas na presença de estímulo inespecífico por PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma Aldrich, E.U.A.) e ionomicina (Sigma Aldrich, E.U.A.) (os dados não foram apresentados). Posteriormente, Brefeldina – BFA (Sigma-Aldrich, E.U.A.) foi adicionada a todos os tubos, na concentração final de 10mcg/mL e as culturas foram incubadas por 4 horas nas mesmas condições. Finalmente, a concentração final de 2mM de

EDTA foi adicionada e as culturas foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 660 x g, por 10 minutos, a temperatura ambiente, para a retirada do sobrenadante para realização do Luminex. Após homogeneização, 300µL das culturas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, E.U.A.) contendo anticorpos para avaliação das subpopulações de linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Para a marcação de moléculas de superfície foram empregados os anticorpos anti-CD3-PE-CyTM7, anti-CD16-PE, anti-CD14-eF450, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD80-APC-H7, anti-CD19-PerCP-CyTM5.5 e anti-CD4-AF700. Os anticorpos para marcadores de superfície, bem como as diluições empregadas encontram-se especificados na tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos marcadores de superfícies e intracitoplasmáticos

Anticorpo	Fluorocromo	Volume por teste (em µL)	Diluição
PE <i>Mouse Anti-Human</i> CD16	PE	2	1/50
eFluor 450 <i>Mouse Anti-Human</i> CD14	eF-450	2	1/50
FITC <i>Mouse Anti-Human</i> HLA-DR	FITC	2	1/50
PE-Cy TM 7 <i>Mouse Anti-Human</i> CD3	PE-Cy TM 7	2	1/50
PerCP-Cy TM 5.5 <i>Mouse Anti-Human</i> CD19	PerCP-Cy TM 5.5	2	1/50
APC <i>Mouse Anti-Human</i> TNF	APC	1	1/100

Após a incubação das culturas por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a lise dos eritrócitos pela adição de 3mL de solução de lise comercial (FACS *Lysing Solution* – BD, E.U.A.) sob agitação no vórtex e

os tubos foram incubados por mais 10 minutos nas mesmas condições. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 600 x g, a 18°C, por 7 minutos. Então, os tubos foram vertidos para descarte do sobrenadante, o sedimento celular ressuspensionado por agitação no vórtex e 500uL de PBS-W (solução de PBS acrescida de 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica) foram adicionados aos tubos. Posteriormente foi feita a permeabilização das células pela adição de 3mL de PBS-P (PBS-W acrescido de 0,5% de saponina) e os tubos foram incubados durante 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguido de centrifugação a 600 x g, a 18°C, por 7 minutos. Após os tubos serem vertidos para descarte do sobrenadante, nova lavagem foi realizada com a adição de 3mL de PBS-W. As células foram ressuspensionadas em 200uL de PBS-W e o anticorpo monoclonal anti-citocinas TNF, previamente diluídos em PBS-P, conforme especificado na Tabela 2.

Após incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi adicionado 100uL de PBS-P em cada poço e a placa foi submetida a centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, a placa foi vertida e a cada poço foram adicionados 200uL de PBS-W. Após centrifugação a 600 x g, a temperatura ambiente, por 10 minutos, a placa foi vertida e as células de cada poço ressuspensionadas em 200uL de PBS. Após um período de 15 minutos a 4°C, foi realizada a aquisição dos parâmetros morfométricos, fenotípicos e funcionais das células do sangue periférico com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa (BD) e análises feitas com o software FlowJo (Treestar).

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism*, versão 8.00 (GraphPad Software, E.U.A). Inicialmente, a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados gerados foi avaliada e confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, para dados não paramétricos e para comparação entre três ou mais grupos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn's. Para análise comparativa entre dois grupos independentes, foi empregado o teste não paramétrico Mann-Witney. Todos os dados que seguirem a distribuição paramétrica foram

analisados por ANOVA *oneway* seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnet post-hoc entre os grupos. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Atividade Mucolítica do BromAc® em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19

Para determinar se o tratamento com BromAc® exerceria um efeito mucolítico nas amostras de aspirado traqueal de maneira dose-dependente, as amostras foram tratadas com NAC a 2%, bem como BromAc® 125 e 250 µg. As amostras de aspirado traqueal foram tratadas por 30 minutos, conforme descrito em material e métodos. A Figura 8 ilustra o fluxo médio de amostras tratadas com BromAc® 125 e 250 µg ou 2% NAC.

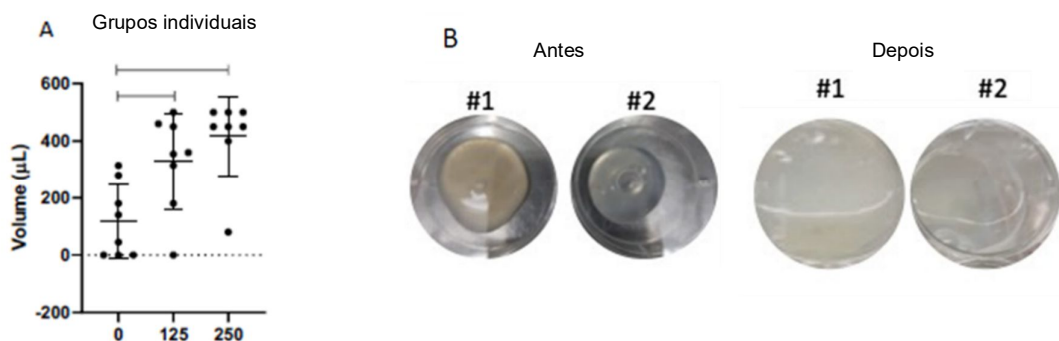


Figura 7: Efeito do BromAc® em amostras de aspirado traqueal de oito pacientes com COVID-19 usando o método de fluxo contínuo. **A:** O volume do fluxo em microlitros é representado em gráficos de dispersão com mediana e intervalo interquartil para uma curva com 0, 125 e 250µg de bromelina além de 2% NAC. **B:** Aspecto visual da amostra de aspirado traqueal antes e após o tratamento BromAc® 250µg.

Um maior fluxo foi observado para as amostras tratadas com BromAc®, de forma dose-dependente, evidenciando seu robusto efeito mucolítico (Figura 8A). O volume recuperado pelo método foi de 68% para amostras tratadas com BromAc® 125µg e acima de 80% para amostras tratadas com BromAc® 250µg. O efeito mucolítico também pode ser facilmente observado no aspecto visual das amostras antes e após o tratamento com BromAc® 250 µg (Figura 8B).

Uma vez que as interações adesivas entre células e outros constituintes do muco podem afetar significativamente a viscoelasticidade do muco, a análise de

celularidade (contagem de células vivas e totais, Figura 9) de amostras de aspirado traqueal foi avaliada após tratamento com BromAc® 250 µg.

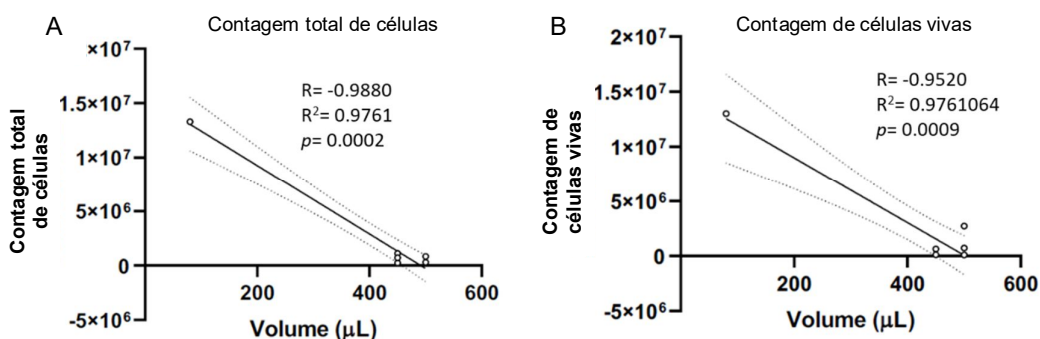


Figura 8: Correlação do efeito mucolítico do BromAc® com a celularidade da amostra de aspirado traqueal. Os gráficos de dispersão XY demonstram os resultados de celularidade, incluindo contagem total de células (**A**) e contagem de células vivas (**B**) de acordo com o volume de fluxo em microlitros.

Os dados demonstram que a celularidade se correlaciona inversamente com o efeito mucolítico de BromAc® (p= 0,0002, correlação de Pearson R²= -0,9880, Figura 9 A). Além disso, essa correlação foi observada também com a contagem de células vivas avaliado em todas as amostras BromAc® (p= 0,0009, correlação de Pearson R² = -0,9520, Figura 9 B). Esses resultados provavelmente indicam que o efeito mucolítico de BromAc® é observado em amostras compostas na maior parte do muco, em vez de amostras com agregados celulares. Novas formulações combinando componentes de dissociação celular como DNase ou heparina ao BromAc® devem ser consideradas para estudos futuros.

Como outro método de medição do impacto do tratamento com BromAc® na viscosidade dos aspirados traqueais de pacientes com COVID-19, realizamos medições reométricas em amostras após o tratamento com BromAc®. A Figura 10. mostra o impacto do tratamento das amostras de aspirado traqueal na viscosidade usando um reômetro.

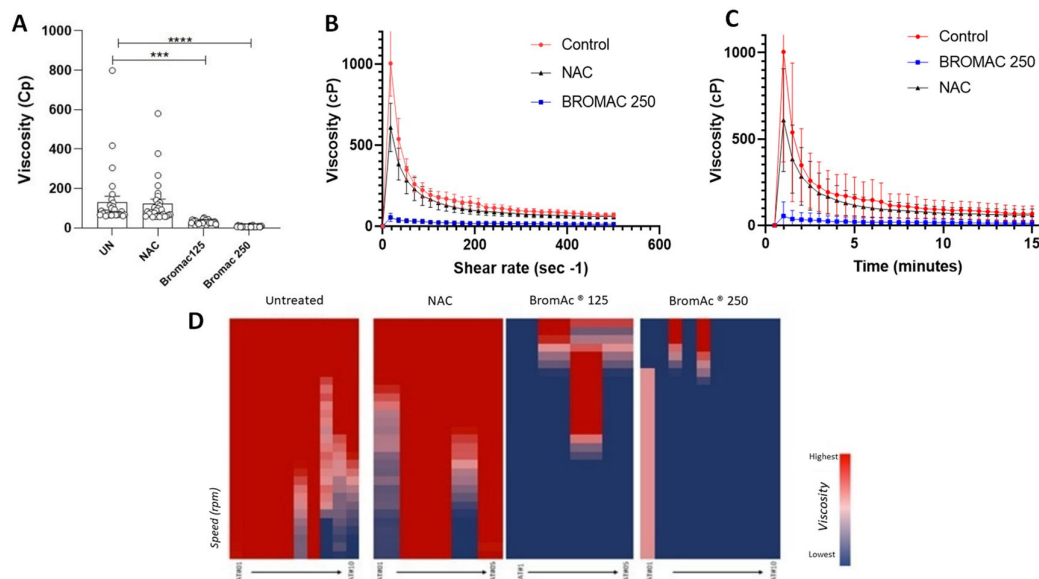


Figura 9: Medições reológicas de amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 não tratados (UN) e após tratamento com N-acetilcisteína (NAC), BromAc® 250 µg. **A:** Resultados de viscosidade plotados como gráficos de dispersão sobre barras flutuantes expressando mínimo e máximo, bem como a linha média. Efeito na viscosidade em função da taxa de cisalhamento (**B**) expressa em seg^{-1} e ao longo do tempo (**C**) expressa em minutos. **D:** Análise de mapa de calor demonstrando a intensidade da viscosidade em amostras individuais. A legenda de cores é fornecida na figura mostrando a viscosidade mais alta (vermelha) e mais baixa (azul)(cP) e Velocidade (rpm).

Como pode ser visto na Figura 10 A, a viscosidade das amostras de aspirado traqueal tratadas com BromAc® 125 ou 250 µg reduziu significativamente em relação às amostras não tratadas ou tratadas com 2% NAC. Quanto ao perfil reológico (B), as três amostras apresentaram características de um fluido viscoelástico não newtoniano. Portanto, sob baixo cisalhamento, a amostra aspirada traqueal se comporta como um sólido elástico (deformação) e sob alto cisalhamento como um líquido viscoso (fluxo). Esta assinatura reológica é característica de polímeros de mucina reticulados em um muco, indicando uma rede levemente emaranhada (CONE, 2009; LAI, et. al., 2009; TOMAIUOLO, et. al., 2014). No entanto, para amostras tratadas, uma maior redução na viscosidade foi observada para tratamento com BromAc® 250 µg, conforme claramente demonstrado por gráficos de dispersão e análise de mapa de calor (Figura 10 B-D). A análise do mapa de calor demonstrou ainda que a deformação e a mucólise são aceleradas por BromAc® 250 µg (Figura 10 D).

5.2 Perfil de resposta mediada por quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento após tratamento com BromAc® em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19

Para expandir ainda mais o efeito do BromAc® nos componentes imunológicos presentes nas amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19, a detecção de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foi realizada após o tratamento com BromAc®. Este experimento foi realizado em condições semelhantes ao experimento de curva anterior, no qual as amostras foram tratadas apenas com NAC a 2%, bem como com BromAc® 125 e 250 µg. Amostras de aspirado traqueal foram tratadas por 60 min nas mesmas condições do primeiro experimento.

Os resultados mostram que o tratamento com BromAc® anulou geral e massivamente as quimiocinas (Figura 11). Digno de nota, BromAc® diminuiu a expressão das quimiocinas CCL3, CXCL8, CXCL10 e CCL11 que estão associadas a neutrófilos pró-inflamatórios e recrutamento de macrófagos para os pulmões.

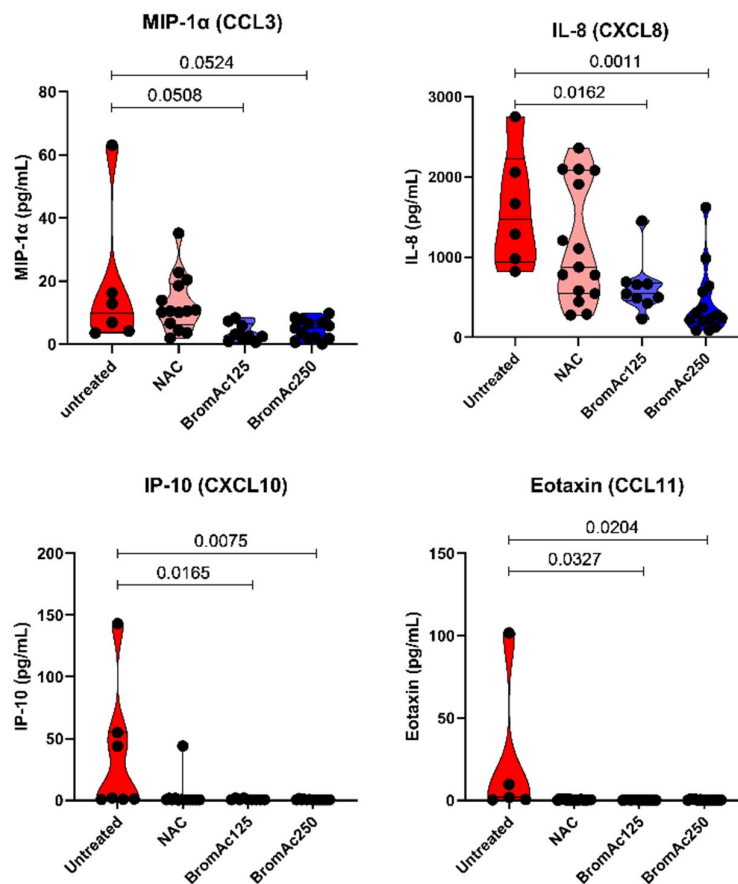


Figura 10: Efeito do BromAc® nas quimiocinas presentes na amostra de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19. Os resultados das quimiocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL.

Além disso, a tempestade de citocinas foi em grande parte alterada pelo tratamento com BromAc®, mostrando níveis mais baixos de IL-6, um importante agente inflamatório no COVID-19 ao lado de IL-15, IFN- γ e IL-17A (Figura 12). Observamos níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias como IFN- α , TNF- α e TNF- β , após o tratamento com BromAc®, porém não houve diferença estatística nos níveis de IL-1 β , IL-1 α e IL-18.

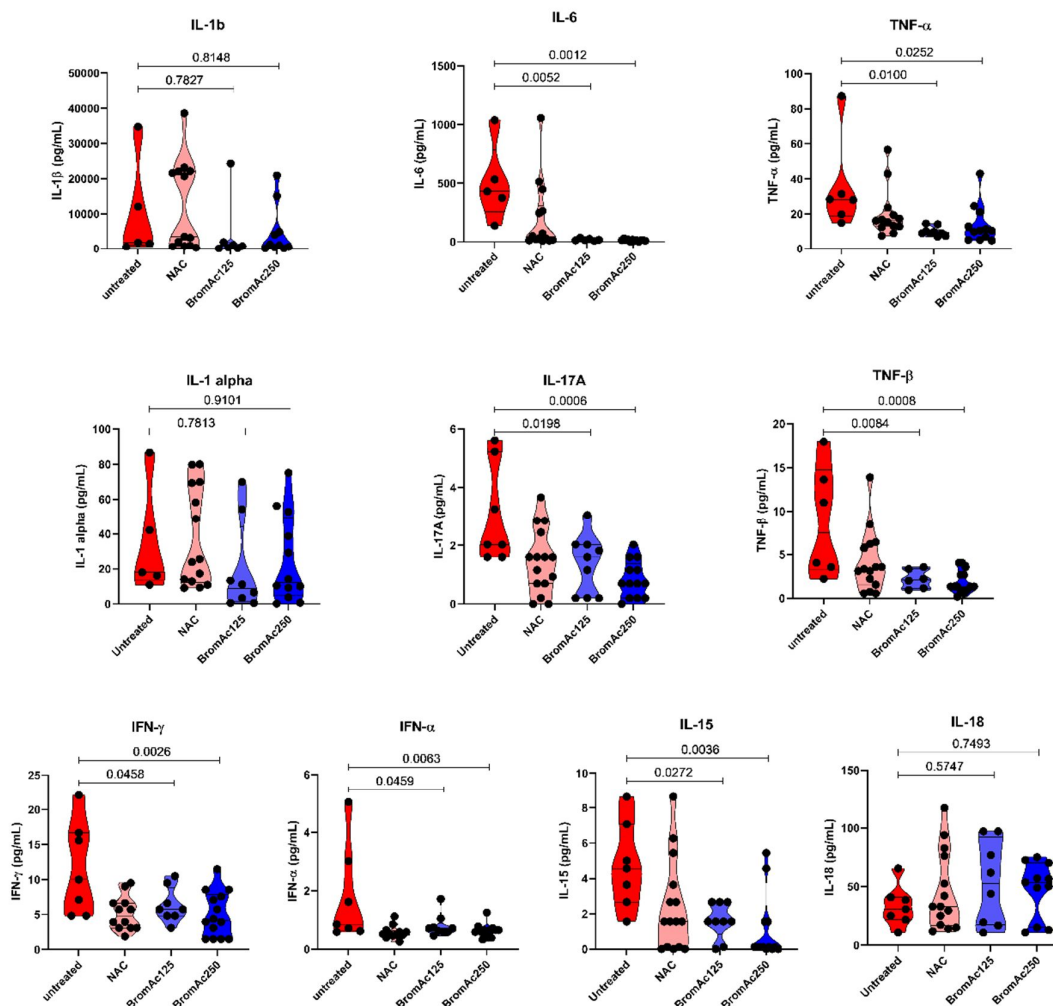


Figura 11: Efeito de BromAc® em citocinas pró-inflamatórias presentes em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados de citocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL.

A análise da atividade *ex-vivo* de BromAc® em fatores de crescimento nas amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 indicou diminuição dos níveis de IL-7. No entanto, outros fatores de crescimento como IL-2 e GM-CSF se mantiveram estáveis após o tratamento com BromAc® (Figura 13). A IL-7 é produzida relativamente em quantidade constante e o seu nível é controlado pelo consumo, principalmente pelas células T, ou seja, níveis circulantes elevados de IL-7 estão associados à depleção do pool de células T na COVID-19.

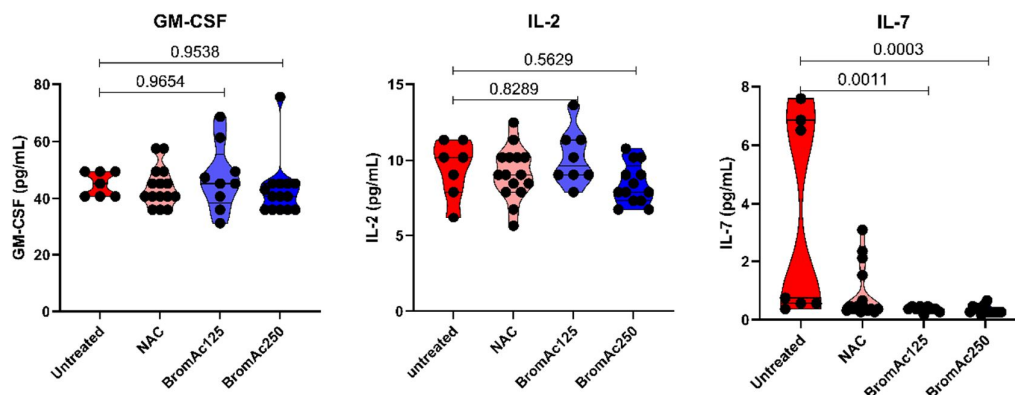


Figura 12: Efeito do BromAc® nos fatores de crescimento presentes nos aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados para fatores de crescimento foram medidos por Luminex e expressos em pg/mL.

Em relação às citocinas reguladoras, os resultados mostram modulação importante dessas moléculas por BromAc (Figura 14). Os níveis de IL-1Ra e IL-22 não foram significativamente alterados pelo tratamento com BromAc® em comparação com NAC. Por outro lado, níveis reduzidos de IL-9, IL-10 e IL-13 foram observados quando os grupos BromAc® foram comparados a amostras de aspirado traqueal não tratadas. Para IL-10, o mesmo efeito foi observado no grupo tratado com NAC, porém, para IL-9, a diminuição significativa nos níveis dessa citocina foi observada apenas nos grupos BromAc®. A regulação excessiva pode estar associada ou pode levar à diminuição da capacidade de resposta, anergia e diminuição das respostas efetoras contra o vírus, que pode ser avaliada de forma cautelosa de como BromAc pode contribuir para a redução da inflamação.

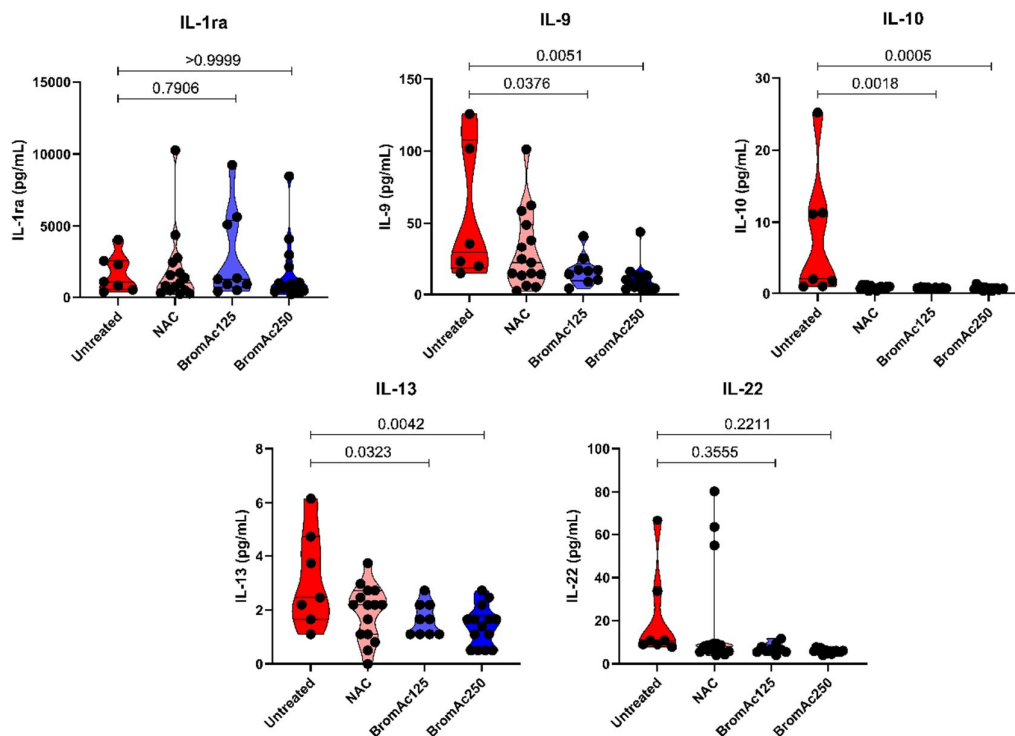


Figura 13: Efeito de BromAc® em citocinas reguladoras presentes em aspirados traqueais de pacientes com COVID-19. Os resultados de citocinas foram medidos por Luminex e são expressos em pg/mL.

5.3 Avaliação do Perfil de mediadores solúveis da resposta imune induzida por SARS-CoV-2 *in vitro* após tratamento com BromAc® em células leucocitárias do sangue periférico

No intuito de avaliar o impacto do BromAc® na tempestade de citocinas induzida exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2, foi padronizado e realizado um ensaio utilizando o vírus inativado em um sistema *in vitro* empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. O sobrenadante de cultura foi coletado e foi realizada a avaliação de mediadores solúveis incluindo quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento.

Em relação as quimiocinas produzidas no ensaio *in vitro*, foi possível observar que o tratamento com BromAc® reduziu de forma significativa todas as quimiocinas analisadas, em relação às amostras estimuladas com o SARS-CoV-

2 inativado (Figura 15). Além disso, é possível também perceber que o estímulo com o vírus inativado foi bem-sucedido, pois promoveu uma produção maior de citocinas e quimiocinas em relação ao grupo controle.

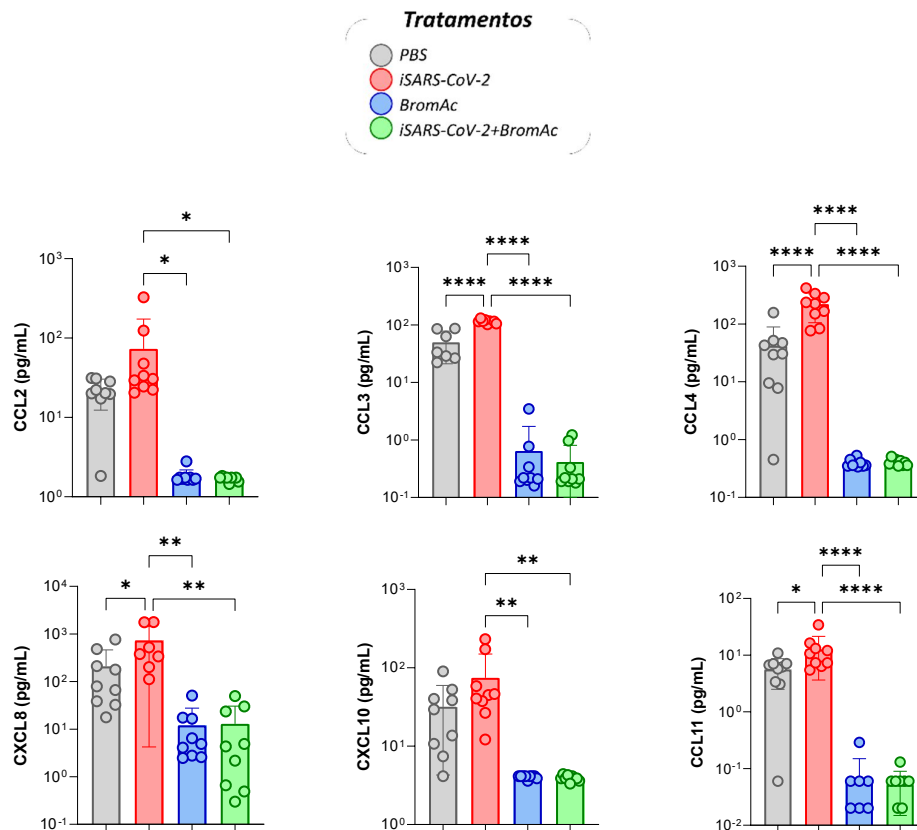


Figura 14: Impacto do BromAc® em quimiocinas induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL (escala log).

Na Figura 16, estão apresentados os resultados da avaliação de citocinas pro-inflamatórias frente ao estímulo com SARS-CoV-2 e após o tratamento com o BromAc®.

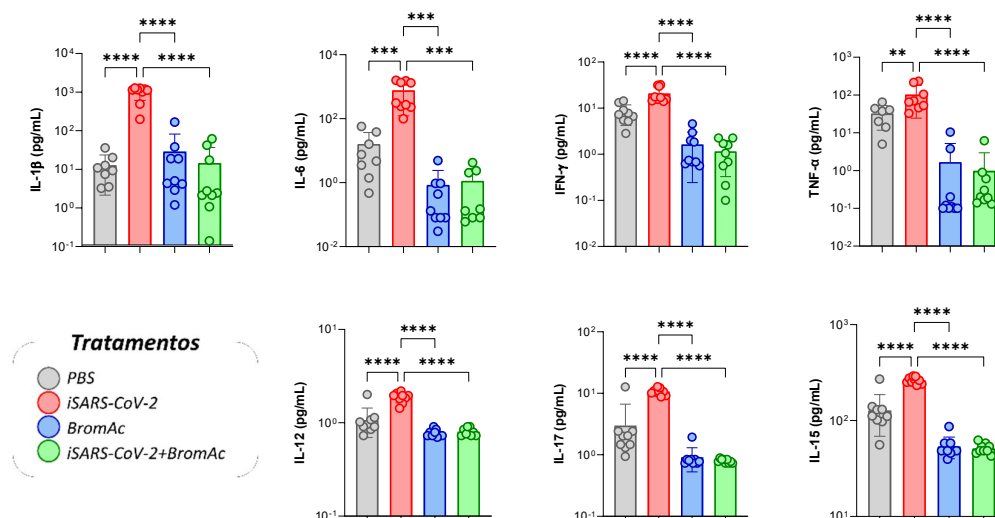


Figura 15: Impacto do BromAc® em citocinas pró-inflamatórias induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL.

Os resultados indicaram que SARS-CoV-2 na sua forma inativada foi capaz de induzir uma produção robusta também de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF e IFN- γ em leucócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis após curta estimulação. Por sua vez, o tratamento com BROMAC® foi capaz de reduzir e até extinguir esta produção como observado na Figura 16.

Os fatores de crescimento são moléculas importantes na imunopatogênese da covid-19 pois são frequentemente associadas ao maior recrutamento de leucócitos e as coagulopatias associadas à doença, como por exemplo o tromboembolismo (AHMAD et. al., 2021).

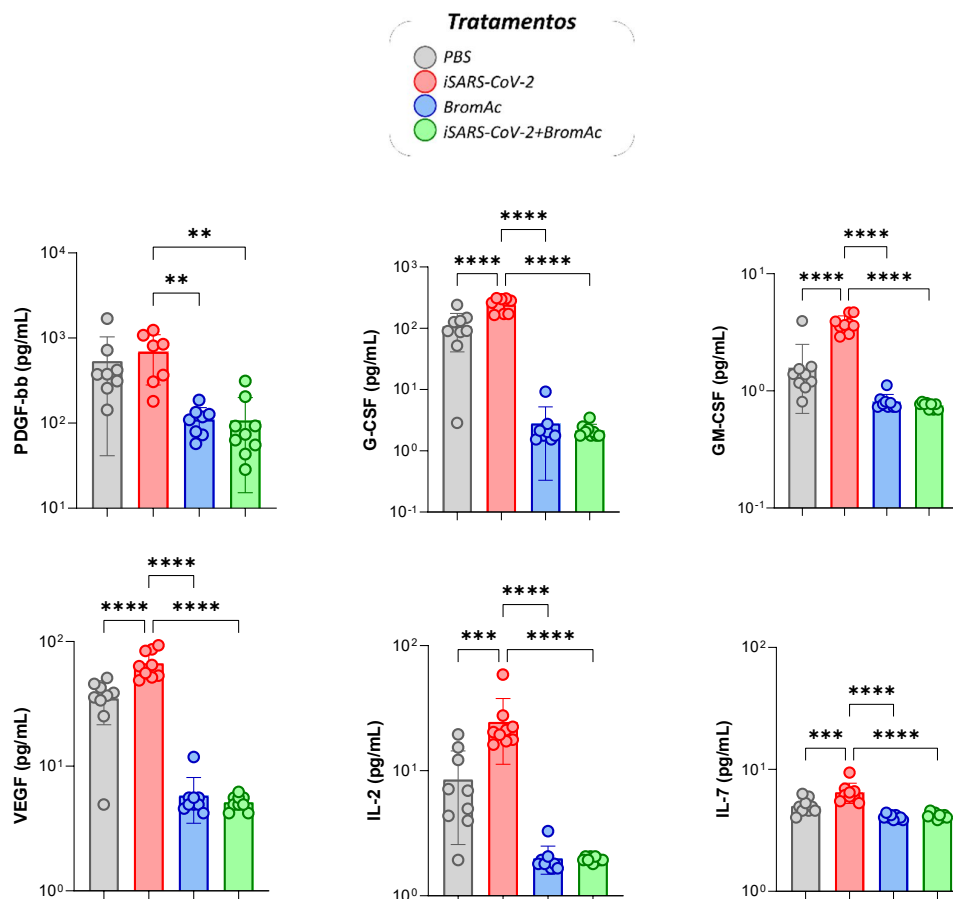


Figura 16: Impacto do BromAc® em fatores de crescimento induzidos exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL.

A análise de fatores de crescimentos os quais PDGF-bb, G-CSF, GM-CSF, VEGF, IL-2 e IL-7, indicou que de maneira semelhante aos paramentos anteriores houve aumento de fatores de crescimento nas amostras estimuladas com o SARS-CoV-2 inativado, ocorrendo redução nas amostras tratadas com o BromAc® (Figura 17). Visto que houve redução do fator de crescimento endotelial, VEGF e redução no fator de crescimento associado ao recrutamento plaquetário, PDGF-bb, o BromAc® poderia ser importante para reverter quadros de tromboembolismo na COVID-19.

Em relação as citocinas reguladoras e do eixo Th2, IL-1ra, IL-9, IL-10 e IL-13 houve uma redução significativa em relação ao grupo estimulado com o vírus, como pode ser visto na Figura 18.

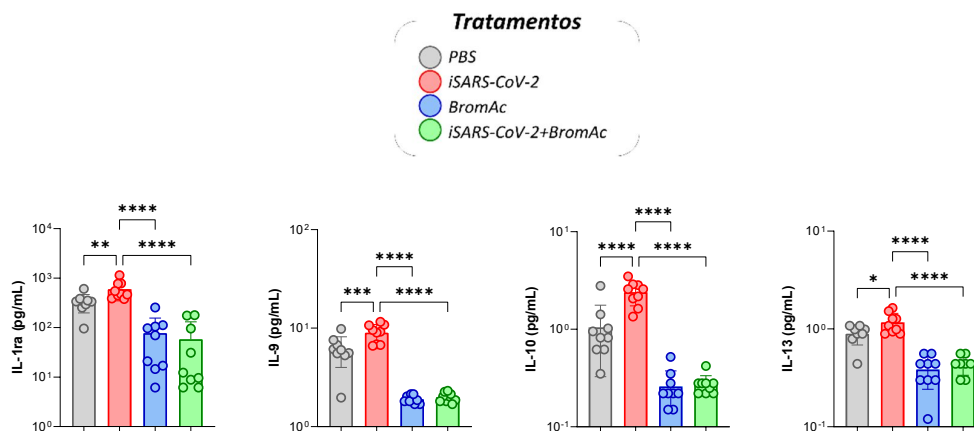


Figura 17: Impacto do BromAc® em citocinas reguladoras induzidas exclusivamente e diretamente pelo vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema in vitro empregando células leucocitárias do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de voluntários saudáveis. A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores. Resultados expressos em pg/mL.

Assim como nos resultados do ensaio *ex-vivo*, podemos ver que o tratamento com o BromAc® também reduz a produção de citocinas reguladoras, principalmente a IL-10 (Figura 18). Porém, este não é um ponto negativo, pois no contexto da tempestade de citocinas induzida pelo SARS-CoV-2 inativado, o tratamento com o BromAc® reduziu os níveis de todas os mediadores inflamatórios.

Portanto, esses resultados podem indicar que o BromAc® pode contribuir para regular as respostas efetoras completas, como as respostas imunes tipo 1 contra SARS-CoV-2 durante a fase viral.

5.4 Avaliação do Perfil de resposta imune celular modulada por BromAc® frente a estimulação *in vitro* com SARS-CoV-2

Para avaliar o perfil anti-inflamatório de BromAc®, foi padronizado e realizado um ensaio utilizando o vírus SARS-CoV-2 inativado em um sistema *in vitro* em que, células provenientes do sangue periférico foram estimuladas com este vírus e na presença ou não do BromAc®. Após a estimulação, a suspensão celular foi incubada com anticorpos para marcação das subpopulações de linfócitos, neutrófilos e monócitos.

Os resultados obtidos mostram que BromAc® foi capaz de modular as populações de neutrófilos CD16⁺ e monócitos CD14⁺ observadas após a estimulação com iSARS-CoV-2. É possível observar um percentual menor destas populações em células tratadas com BromAc® na presença ou ausência de iSARS-CoV-2 (Figura 19). O tratamento com BromAc® também mostrou aumentar o marcador de ativação HLA-DR em populações de monócitos CD14⁺, em comparação com o estímulo viral. Esses resultados indicam que BromAc® pode ter um efeito modulador, reduzindo populações de neutrófilos e monócitos, mas ao mesmo tempo, aumentando a ativação de células monocíticas expressando HLA-DR.

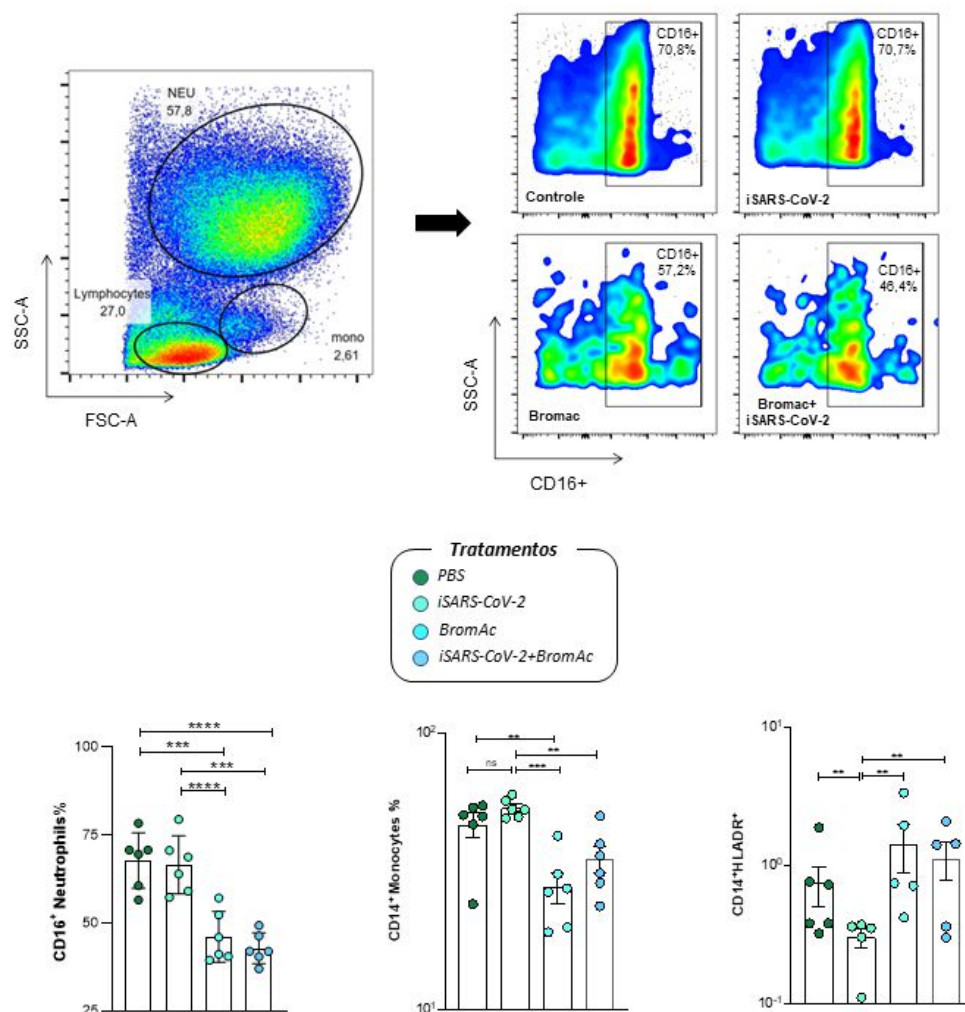


Figura 19: Estratégias de *gating* para visualização das subpopulações de leucócitos, seguido da expressão do marcador CD16 para os diferentes tratamentos (A); e o perfil imunomodulatório de BromAc® em neutrófilos e monócitos estimulados com iSARS-CoV-2 em um sistema in vitro empregando células do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de 6 voluntários saudáveis (B). A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores.

Ao avaliar o efeito de BromAc® nas subpopulações de linfócitos, é possível ver um aumento significativo da contagem de linfócitos, independentemente do estímulo com o iSARS-CoV-2 (Figura 20). Este aumento é justificado pela redução do número de neutrófilos, mostrados no resultado anterior. É possível observar também que o tratamento com BromAc® diminui a produção de TNF pelas células B CD19⁺, em comparação com o grupo estimulado com o vírus inativado.

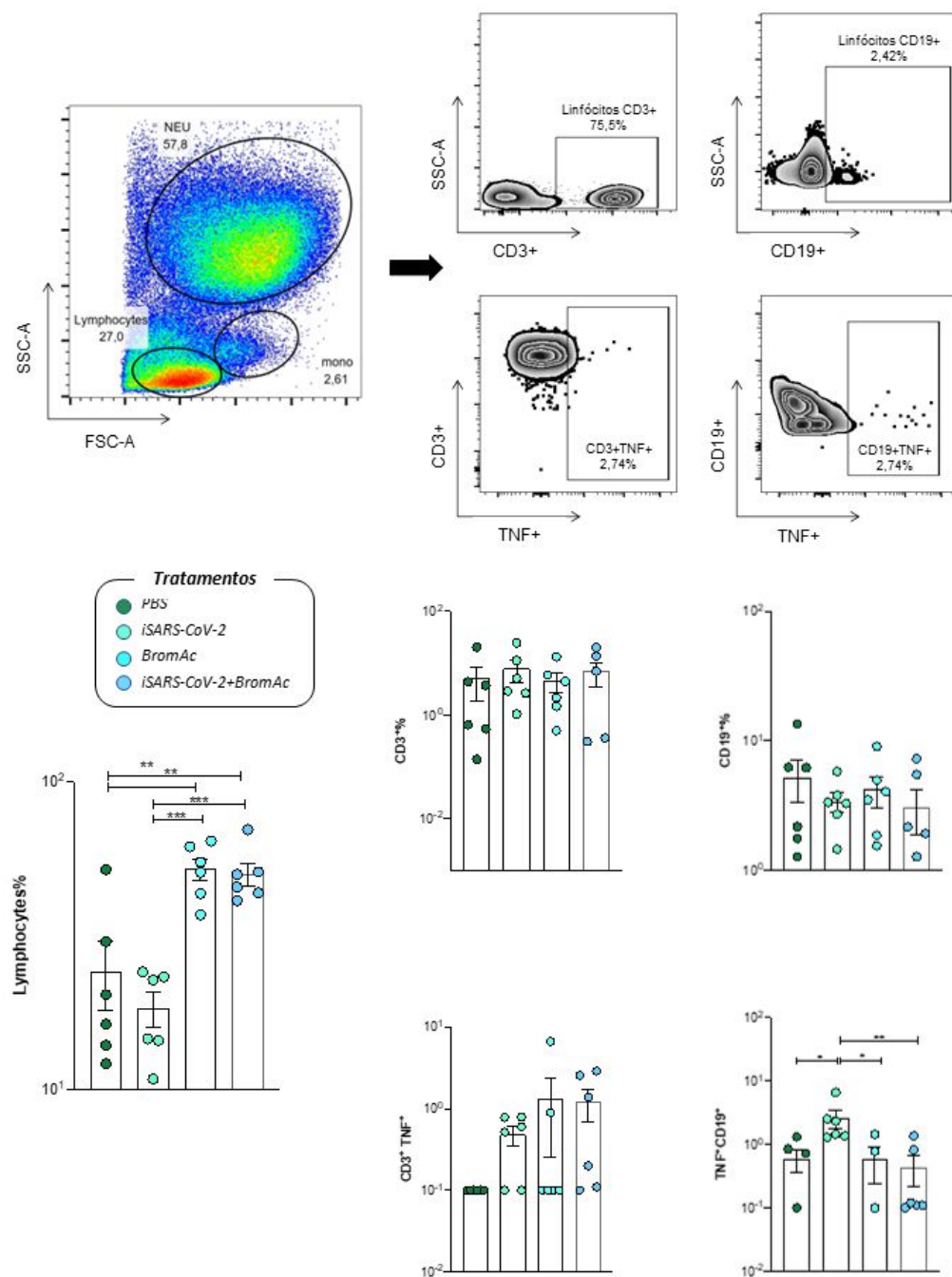


Figura 20: Estratégias de *gating* para visualização das subpopulações de leucócitos (A) e o perfil imunomodulador de BromAc® em linfócitos estimulados com iSARS-CoV-2 em um sistema in vitro empregando células do sangue periférico obtidas de sangue heparinizado coletado de 6 voluntários saudáveis (B). A legenda mostra os diferentes tratamentos realizados e suas respectivas cores.

6. DISCUSSÃO

Existem muitas alterações patológicas nos pulmões durante a COVID-19 e elas evoluem com o tempo. A doença precoce é caracterizada por capilarite neutrofilica exsudativa com trombose. Alterações tardias que ocorrem em média por volta do décimo dia de infecção incluem dano alveolar difuso, trombose intravascular, infecção, coagulopatia intravascular disseminada (DIC) e proliferação de fibroblastos intra-alveolares posteriores (BÖSMÜLLER, et al., 2020).

Embora o COVID-19 seja uma doença multissistêmica, a insuficiência respiratória é uma causa importante de hospitalização e morte. A patologia pulmonar no COVID-19 é complexa, variável e dependente do tempo, a obstrução das vias aéreas pelo escarro é observada em uma proporção significativa de pacientes e afeta negativamente a ventilação. O caráter do escarro no COVID-19 é observado como sendo altamente viscoso (Lu, et al., 2021) e uma proporção maior de pacientes com a COVID grave apresentou escarro pegajoso de grau 3 (WANG, et. al., 2020). A broncoscopia revelou obstrução extensa de muco ou muco em 64% (TABAN, RICHARDS, 2020) e 82%, e melhora na oxigenação após a depuração. Tampões mucosos foram um fator prognóstico adverso (LARRIVA, et. al., 2021). A obstrução do tubo endotraqueal devido ao escarro mucinoso também é um problema reconhecido com muito mais frequência em pacientes com COVID-19 do que em outros que requerem ventilação (WILES, et. al., 2021).

As características do escarro em pacientes com COVID-19 grave podem se correlacionar com o resultado. Wang et al. (2020) descreveram que o escarro cada vez mais pegajoso estava associado a doenças críticas, sendo a viscosidade a principal variável relacionada à depuração do escarro. O escarro altamente viscoso no COVID-19 explica as altas pressões necessárias para a ventilação e a dificuldade em aspirar o escarro do COVID-19. Portanto, drogas expectorantes eficazes são fortemente recomendadas durante o manejo das vias aéreas (CHEN, et. al., 2020).

O muco alveolar afeta a barreira sangue-gás, induzindo hipóxia, e fornece evidência direta do papel do muco nas doenças respiratórias e o mecanismo que procuramos interromper com BromAc®. Portanto, pela primeira vez, avaliamos o efeito do BromAc® no escarro de COVID-19 como uma estratégia para reduzir a viscosidade do escarro e melhorar o manejo das vias aéreas e o prognóstico do paciente.

O tratamento do escarro de COVID-19 com BromAc® melhorou o fluxo (Figura 8 A) e reduziu eficientemente a viscosidade (Figura 10 A-D) quando comparado a amostras não tratadas ou amostras tratadas apenas com NAC. Todas as amostras (sem tratamento, NAC e BromAc®) apresentaram perfil viscoelástico (Figura 10 B), o que está de acordo com a literatura (LAI, et. al., 2009; ATANASOVA, REZNIKOV, 2019). A análise de celularidade (Figura 9 A-B) mostrou uma correlação inversa com o efeito mucolítico do BromAc®. O comportamento fluido viscoelástico do muco é diretamente proporcional ao peso molecular e à concentração de seus componentes, bem como à sua configuração espacial (CARRILHO, et. al., 2016). Uma contribuição recente relata alto teor de sólidos e proteínas no escarro de COVID-19 semelhante ao observado na fibrose cística e identifica altos níveis de DNA e hialuronano (KRATOCHVIL, et. al., 2022). Nossos estudos demonstram que o uso de BromAc® proporciona uma grande redução na viscosidade do escarro de COVID-19 no primeiro minuto (Figura 10 C), o que prevemos que foi benéfico para melhorar a complacência pulmonar na ventilação mecânica e melhorar a remoção do escarro. Essa maior e rápida redução da viscosidade do escarro de COVID-19 pode ser explicada pelo efeito sinérgico das duas drogas proteolíticas (NAC e bromelina) presentes no BromAc®, que potencializaram o efeito proteolítico.

Vários estudos teóricos e experimentais demonstraram que o aumento da viscosidade e da tensão superficial do líquido da superfície das vias aéreas são provavelmente responsáveis pela lesão pulmonar induzida por ventilador (em inglês, VILI). Dois principais mecanismos físicos para VILI são a super distensão do tecido pulmonar causada por alterações induzidas pela tensão superficial na micromecânica interalveolar e atelectotrauma nas células epiteliais durante a

reabertura e fechamento repetitivo das vias aéreas (CHEN, et. al., 2020). Existe uma forte ligação entre a infecção viral e a produção de muco por meio de várias vias de sinalização, incluindo IL-6, IL-10 e TNF, em que a tempestade de citocinas causa hipersecreção súbita de muco. Embora a infecção viral possa causar diretamente o excesso de produção de escarro pelas células respiratórias, a tempestade de citocinas causa superprodução de muco por meio das vias STAT, MAPK, NKKB nas células e vias de sinalização IFN-AhR no COVID. A produção de muco em doenças respiratórias está normalmente relacionada à inflamação e no COVID-19, sabe-se que a mucina é induzida pelo interferon descoberto no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) de pacientes e animais com COVID-19 (KHAN, et. al., 2021; LIU, et. al., 2020).

Em casos graves, a tempestade de citocinas é devida ao excesso de produção de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF (ATANASOVA, REZNIKOV, 2019). Níveis séricos aumentados de IL-7, IL-10, fator estimulante de colônia de macrófagos (CSF) (M-CSF), granulócitos CSF (G-CSF), granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína induzida por interferon gama 10KD (IP- 10), proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) e TNF são vistos, especialmente em pacientes com doença grave (COSTELA-RUIZ, et. al., 2020; HU, et. al., 2021).

As citocinas são polipeptídios e, portanto, um substrato para a degradação da bromelina. No entanto, há uma complexidade adicional em que a bromelina pode estimular ou inibir a liberação de citocinas das células em diferentes configurações (BARTH, et. al., 2005; HUANG, et. al., 2008). A bromelina reduziu G-CSF, GMCSF, IFN- γ , MIP e TNF por tecido inflamado em IBD (ONKEN, et. al., 2008). A bromelina pode reduzir a migração de neutrófilos para a inflamação e, embora isso possa estar relacionado à redução de citocinas, também é provável que seja devido à remoção de receptores de superfície celular em neutrófilos, incluindo CD44, CD62 e receptores de quimiocinas e tem efeitos semelhantes ação em células tumorais (FITZHUGH, et. al., 2008; KLEEF, et. al., 1996; TYSNES, et. al., 2001).

Níveis elevados de citocinas séricas no COVID-19 estão claramente relacionados à gravidade da doença e ao risco de morte. Acredita-se que a tempestade de citocinas seja responsável pelo aumento das secreções de muco brônquico no COVID-19 (KHAN, et. al., 2021). Talvez de maior relevância para o COVID-19, a bromelina reduziu a inflamação das vias aéreas em um modelo de camundongo com inflamação induzida por ovalbumina com redução de leucócitos e eosinófilos no lavado broncoalveolar (BAL), redução do infiltrado pulmonar celular e redução de interleucinas séricas IL-4, IL-12, IL-17 e IFN- α . A bromelina administrada por via intraperitoneal demonstrou atenuar o desenvolvimento de doença alérgica em um modelo de camundongo de doença alérgica das vias aéreas induzida por ovoalbumina (SECOR, et. al., 2012; SECOR, et. al., 2006). Leucócitos e citocinas do lavado broncoalveolar, histologia pulmonar e hiperresponsividade das vias aéreas foram medidos. O tratamento com bromelina resultou em redução de leucócitos no BAL, eosinófilos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, T CD4/CD8⁺ e IL-13. Em um estudo feito por Giamarellos-Bourboulis (2020), as contagens absolutas de linfócitos CD3⁺CD4⁺CD45⁺, linfócitos CD3⁺CD8⁺CD45⁺, células CD3⁻CD16⁺CD56⁺CD45⁺ e linfócitos CD19⁺CD45⁺ foram menores entre pacientes com COVID-19 em comparação com 10 indivíduos saudáveis ajustados para idade e gênero. Da mesma forma, a bromelina teve um efeito anti-inflamatório nas vias de sinalização do fator nuclear kappa B (NFkB) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) em células de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo de uma maneira dependente da dose (INSUAN, et. al., 2021). Devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, a bromelina foi sugerida como tratamento para o COVID-19 (ESAM, TALOKI, 2020). A bromelina sozinha demonstrou ter um efeito antiviral direto no vírus SARS-CoV-2, que causa o COVID-19, provavelmente devido ao seu efeito na proteína spike ou nos receptores utilizados pelo vírus para entrada no hospedeiro (SAGAR, et. al., 2020). Esta pesquisa foi realizada em células Vero E6 e exigiu doses significativamente mais altas do que a combinação BromAc®. A bromelina também foi usada em um modelo de pneumonia viral com o vírus Semliki Forest (KENNEDY, 1974; SCHLEGEL, et. al., 1991).

Após a estimulação do sangue periférico de pacientes saudáveis com SARS-CoV-2 inativado percebeu-se que o BromAc® diminuiu a modulação de neutrófilos CD16⁺. Ekstedt et. al. (2020) acreditam que o neutrófilo é um dos mais importantes agentes de hiper inflamação que leva ao desconforto respiratório agudo no COVID-19, pois evidências indicam que os neutrófilos, durante a infecção viral, atuam indiretamente como células imunomoduladoras e diretamente pela secreção de citocinas, internalização do vírus e produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Além disso, os neutrófilos estão aumentados em número não apenas na circulação periférica, mas também foram encontrados abundantemente no tecido pulmonar durante autópsias de pacientes que morreram de COVID-19 (BARNES, et. al., 2020). O mesmo efeito do BromAc é notado em monócitos CD14⁺, e que assim como os neutrófilos são importantes no processo inflamatório. Monócitos podem ser divididos em três classes baseados na expressão dos marcadores CD14 e CD16: Clássicos (CD14⁺CD16⁻), não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺) e intermediários (CD14⁺CD16⁺). Sob condições patológicas, incluindo infecções virais, monócitos, ativados e recrutados por mediadores inflamatórios, infiltram tecidos afetados e adquirem macrófagos inflamatórios. Na COVID-19 estes monócitos podem alterar o metabolismo da glicose, promovendo a replicação do SARS-CoV-2 (KNOLL, et. al., 2021). BromAc também aumentou significativamente a expressão do marcador de ativação HLA-DR em comparação com as amostras estimuladas com o iSARS-CoV-2. Em uma análise de sequenciamento de scRNA de PBMCs de pacientes com COVID-19 grave revelou que oito genes que codificam moléculas HLA de classe II estão reguladas negativamente em todos os pacientes do estudo, mais significativo ainda em pacientes dependentes de ventilação e idosos (WILK, et. al., 2020).

A acetilcisteína é um genérico amplamente utilizado, administrado rotineiramente para overdose de paracetamol (ATKINSON, 2002). Tem outras indicações, incluindo proteção renal, mas é amplamente utilizado em doenças respiratórias como mucolítico administrado por via oral (POOLE, et. al., 2019). A acetilcisteína atua como um mucolítico devido ao seu efeito nas pontes dissulfeto (SANTUS, et. al., 2014). Tem sido aplicado na fibrose cística e bronquite (POOLE, et. al., 2019; CAZZOLA, et.al., 2015; DEKHUIJZEN, 2004), no entanto,

foi relatado por Atkinson (2002) que a acetilcisteína produz mucorréia ao nebulizar uma solução de 5 a 10%, que é hiper osmolar. Recomenda-se uma solução a 2% (ou 20 mg/mL). Em um estudo clínico de 10 pacientes submetidos a cirurgia torácica, a acetilcisteína foi nebulizada no pós-operatório. Este foi um estudo duplo-cego. Verificou-se que a acetilcisteína reduz a viscosidade do escarro e aumenta o volume de escarro expectorado e a oxigenação em comparação com o controle (solução salina) (GALLON. 1996).

BromAc® foi desenvolvido para dissolver o tumor pseudomixoma peritoneal altamente mucinoso e seu mecanismo de ação envolve a quebra síncrona de ligações peptídicas, glicoproteicas e SS (AMINI, et. al., 2013). Já é conhecido por remover uma variedade de tipos de mucinas das células cancerígenas (PILLAI, et. al., 2014), que é a base de seu potencial em doenças respiratórias secretoras de mucina. Nossa hipótese é que BromAc® exerce seu efeito anti-citocina por clivagem proteolítica de quimiocinas e cadeias polipeptídicas de citocinas e pela quebra de pontes dissulfeto. Os efeitos mucolíticos do BromAc® diminuem na presença de células vivas devido à agregação celular. Isso está sendo elaborado para tentar melhorar e permitir formulações mucolíticas mais robustas de BromAc® em secreções com alta celularidade.

Como uma nova combinação de drogas em oncologia, já foi aplicada em ensaios de fase 1 e 1B em concentrações muito mais altas do que as usadas neste estudo, embora intraperitonealmente, e está entrando em ensaios de fase 2 na UE e nos EUA para o raro tumor mucinoso (VALLE, et. al., 2021). Akhter et al. (2021) relataram anteriormente uma inibição sinérgica da infecciosidade de duas cepas de SARS-CoV-2 cultivadas em células Vero, BGM e CALU-3, mostrando um efeito antiviral de redução de 4 log por BromAc®. Resta saber se o BromAc® pode atuar como um antiviral ou ser uma intervenção útil para esta ação na fase avançada da doença. O BromAc® já foi administrado com segurança nas vias aéreas em quatro modelos em duas espécies, incluindo um modelo de recuperação de 28 dias. Cada um desses modelos não apresentou toxicidade clínica, na histologia ou no BAL, com concentrações de tratamento de até 500 ug/20 mg/mL três vezes ao dia durante cinco dias em comparação com o controle. Em um ensaio clínico randomizado, camundongos foram expostos a

BromAc® nebulizado (dose baixa e alta) por 10 minutos, 3 vezes ao dia, durante 5 dias. Todos os camundongos no modelo de recuperação de 28 dias sobreviveram até o ponto final (dia 33) sem evidência de toxicidade. No pulmão, a histopatologia em animais tratados, demonstrou uma menor incidência de anormalidade do que no grupo controle, apoiando um efeito de desobstrução das vias aéreas do BromAc® (dados não publicados). Os estudos clínicos planejados no COVID-19 visam avaliar a segurança e a eficácia preliminar do BromAc® em participantes com infecção estabelecida pelo COVID-19 que foram internados no hospital. Os participantes terão doença moderada a grave, receberão tratamento padrão e não foram ventilados ou terão doença crítica, embora seja possível que o BromAc® possa ter um papel no tratamento de pacientes críticos no futuro (NCT05220605 e NCT05258682). A aplicação de um fármaco como o BromAc®, particularmente com suas potentes propriedades mucolíticas, pode melhorar a oxigenação. Escarro espesso, gelatinoso e mucinoso é observado em muitos pacientes com COVID-19, encontrado na broncoscopia, radiologia, autópsia, além de formação hialina, restos celulares e fibrina, que se acumula nos alvéolos como resultado de inflamação e SDRA. Todos, por sua vez, prejudicam a oxigenação. Embora reconheçamos que a fluidificação dessas secreções espessas pode resultar no acúmulo de secreções nos alvéolos, medidas clínicas podem ser implementadas, como sucção, pronação ou drenagem postural e fisioterapia respiratória. A depuração de fluidos, efeitos colaterais e eventos adversos ao tratamento foram abordados em estudos clínicos.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o BromAc exibiu um efeito mucolítico robusto em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19 de maneira dose-dependente. Além disso, o BromAc demonstrou atividade anti-inflamatória, reduzindo a ação da tempestade de citocinas em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19. A combinação apresentou redução de quimiocinas como MIP-1 α , CXCL8, MIP-1 β , MCP-1 e IP-10, em comparação com NAC isoladamente. Foi também observado a ação dos

compostos combinados sobre citocinas reguladoras como IL-10. Mesmo na concentração de 250 μ g, atua na IL-6, uma das principais citocinas pró-inflamatórias e nos fatores de crescimento, demonstrando redução de G-CSF e VEGF-D nas concentrações de 125 e 250 μ g. Além disso, o BromAc foi capaz de modular as respostas celulares após o tratamento ex vivo de células sanguíneas. Esses resultados indicam um efeito mucolítico e anti-inflamatório robusto do BromAc em aspirados traqueais de pacientes críticos, indicando seu potencial como estratégia terapêutica para o COVID-19.

8. REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, Zeinab, et al. "Evaluation of the Current Therapeutic Approaches for COVID-19: A Systematic Review and a Meta-analysis". *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, março de 2021, p. 607408. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.607408>.

AMINI, Afshin, et al. "Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21)". *OncoTargets and Therapy*, vol. 6, dezembro de 2013, p. 403–09. Taylor and Francis+NEJM, <https://doi.org/10.2147/OTT.S43072>.

ATANASOVA, Kalina R., e Leah R. Reznikov. "Strategies for measuring airway mucus and mucins". *Respiratory Research*, vol. 20, no 1, novembro de 2019, p. 261. BioMed Central, <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1239-z>.

ATKINSON, M. C. "The use of N-acetylcysteine in intensive care". *Critical Care and Resuscitation*, vol. 4, no 1. search.informit.org (Atypon), <https://doi.org/10.3316/informit.522270219200243>. Acessado 29 de março de 2023.

BARNES, Betsy J., et al. "Targeting Potential Drivers of COVID-19: Neutrophil Extracellular Traps". *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 217, no 6, junho de 2020, p. e20200652. PubMed, <https://doi.org/10.1084/jem.20200652>.

BARTH, H., et al. "In Vitro Study on the Immunological Effect of Bromelain and Trypsin on Mononuclear Cells from Humans". *European Journal of Medical Research*, vol. 10, no 8, agosto de 2005, p. 325–31.

BÖSMÜLLER, Hans, et al. "The Evolution of Pulmonary Pathology in Fatal COVID-19 Disease: An Autopsy Study with Clinical Correlation". *Virchows Archiv*, vol. 477, no 3, setembro de 2020, p. 349–57. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02881-x>.

“BromAc@Facts”. BromAc@Facts, <https://mucpharm.com>. Acessado 19 de novembro de 2021.

CARRILLO, Lizbeth, et al. “Rheological Study of Healthy Chicken’s Pooled Tracheobronchial Secretions and Its Modification by Mucolytics Drugs”. *Poultry Science*, vol. 95, no 11, novembro de 2016, p. 2667–72. ScienceDirect, <https://doi.org/10.3382/ps/pew209>.

CAZZOLA, Mario, et al. “Influence of N-Acetylcysteine on Chronic Bronchitis or COPD Exacerbations: A Meta-Analysis”. *European Respiratory Review*, vol. 24, no 137, setembro de 2015, p. 451–61. err.ersjournals.com, <https://doi.org/10.1183/16000617.00002215>.

CHEN, Zhenglong, et al. “Effects of the Lower Airway Secretions on Airway Opening Pressures and Suction Pressures in Critically Ill COVID-19 Patients: A Computational Simulation”. *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 48, no 12, dezembro de 2020, p. 3003–13. Springer Link, <https://doi.org/10.1007/s10439-020-02648-0>.

CONE, Richard A. “Barrier Properties of Mucus”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no 2, fevereiro de 2009, p. 75–85. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.008>.

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. “The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2”. *Nature Microbiology*, vol. 5, nº 4, abril de 2020, p. 536–44. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

Coronavírus Brasil. <https://covid.saude.gov.br/>. Acessado 29 de março de 2023.

COSTELA-RUIZ, Víctor J., et al. “SARS-CoV-2 Infection: The Role of Cytokines in COVID-19 Disease”. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 54, agosto de 2020, p. 62–75. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.001>.

COUZIN-FRANKEL, Jennifer. Pfizer Antiviral Slashes COVID-19 Hospitalizations. <https://www.science.org/content/article/pfizer-antiviral-slashes-covid-19-hospitalizations>. Acessado 14 de dezembro de 2021.

CUI, Jie, et al. "Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses". *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, nº 3, março de 2019, p. 181–92. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

DEKHUIJZEN, P. N. R. "Antioxidant Properties of N-acetylcysteine: Their Relevance in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *European Respiratory Journal*, vol. 23, no 4, abril de 2004, p. 629–36. erj.ersjournals.com, <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00016804>.

de WIT, Emmie, et al. "SARS and MERS: Recent Insights into Emerging Coronaviruses". *Nature Reviews Microbiology*, vol. 14, nº 8, agosto de 2016, p. 523–34. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

EKSTEDT, Sandra, et al. "A Prolonged Innate Systemic Immune Response in COVID-19". *Scientific Reports*, vol. 12, no 1, junho de 2022, p. 9915. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13986-5>.

ESAM, Z; TALOKI, Z. "Bromelain and its potential therapeutic effects in COVID-19-induced respiratory complications". *The Journal of Medical Research*, vol. 6, no 6, dezembro de 2020, p. 313–14. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.31254/jmr.2020.6614>.

FITZHUGH, David J., et al. "Bromelain Treatment Decreases Neutrophil Migration to Sites of Inflammation". *Clinical Immunology*, vol. 128, no 1, julho de 2008, p. 66–74. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.015>.

Folha informativa sobre COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. <https://www.paho.org/pt/covid19>. Acessado 19 de novembro de 2021.

GALLON, A. M. "Evaluation of Nebulised Acetylcysteine and Normal Saline in the Treatment of Sputum Retention Following Thoracotomy." *Thorax*, vol. 51, no 4, abril de 1996, p. 429–32. [thorax.bmj.com](https://doi.org/10.1136/thx.51.4.429), <https://doi.org/10.1136/thx.51.4.429>.

GAO, Ya-dong, et al. "Risk Factors for Severe and Critically Ill COVID-19 Patients: A Review". *Allergy*, vol. 76, nº 2, fevereiro de 2021, p. 428–55. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1111/all.14657>.

GARCÍA, Luis F. "Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19". *Frontiers in Immunology*, vol. 11, junho de 2020, p. 1441. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01441>.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J., et al. "Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure". *Cell Host & Microbe*, vol. 27, no 6, junho de 2020, p. 992-1000.e3. www.cell.com, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.009>.

HUANG, Jing-Rong, et al. "Bromelain Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Production in Human THP-1 Monocytes via the Removal of CD14". *Immunological Investigations*, vol. 37, nº 4, janeiro de 2008, p. 263–77. Taylor and Francis+NEJM, <https://doi.org/10.1080/08820130802083622>.

INSUAN, Orapin, et al. "Anti-Inflammatory Effect of Pineapple Rhizome Bromelain through Downregulation of the NF-B- and MAPKs-Signaling Pathways in Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated RAW264.7 Cells". *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 43, no 1, junho de 2021, p. 93–106. www.mdpi.com, <https://doi.org/10.3390/cimb43010008>.

JAMISON, David A., et al. "A Comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 Review, Part 1: Intracellular Overdrive for SARS-CoV-2 Infection". *European Journal of Human Genetics*, vol. 30, no 8, agosto de 2022, p. 889–98. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>.

KENNEDY, S. I. T. “The Effect of Enzymes on Structural and Biological Properties of Semliki Forest Virus”. *Journal of General Virology*, vol. 23, no 2, 1974, p. 129–43. *Microbiology Society Journals*, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-23-2-129>.

KHALIL, Omar Arafat Kdudsi, e Sara da Silva Khalil. “SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição”. *Revista de Medicina*, vol. 99, nº 5, dezembro de 2020, p. 473–79. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i5p473-479>.

KHAN, Mohsin Ali, et al. “Cytokine Storm and Mucus Hypersecretion in COVID-19: Review of Mechanisms”. *Journal of Inflammation Research*, vol. 14, janeiro de 2021, p. 175–89. www.dovepress.com, <https://doi.org/10.2147/JIR.S271292>.

KLEEF, R., et al. “Selective Modulation of Cell Adhesion Molecules on Lymphocytes by Bromelain Protease 5”. *Pathobiology*, vol. 64, no 6, 1996, p. 339–46. www.karger.com, <https://doi.org/10.1159/000164070>.

KNOLL, Rainer, et al. “Monocytes and Macrophages in COVID-19”. *Frontiers in Immunology*, vol. 12, 2021. *Frontiers*, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.720109>.

KRATOCHVIL, Michael J., et al. “Biochemical, Biophysical, and Immunological Characterization of Respiratory Secretions in Severe SARS-CoV-2 Infections”. *JCI Insight*, vol. 7, no 12, junho de 2022, p. e152629. *PubMed*, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.152629>.

LAI, Samuel K., et al. “Micro- and Macrorheology of Mucus”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no 2, fevereiro de 2009, p. 86–100. *ScienceDirect*, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.012>.

LARRIVA, Marisol Arenas-De, et al. “The Role of Bronchoscopy in Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia”. *ERJ Open Research*, vol. 7, no 3, julho de 2021. openres.ersjournals.com, <https://doi.org/10.1183/23120541.00165-2021>.

LI, Geng, et al. "Coronavirus Infections and Immune Responses". *Journal of Medical Virology*, vol. 92, nº 4, abril de 2020, p. 424–32. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>.

LIU, Yuying, et al. "Mucus Production Stimulated by IFN-AhR Signaling Triggers Hypoxia of COVID-19". *Cell Research*, vol. 30, no 12, dezembro de 2020, p. 1078–87. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00435-z>.

LU, Wenju, et al. "Elevated MUC1 and MUC5AC Mucin Protein Levels in Airway Mucus of Critical Ill COVID-19 Patients". *Journal of Medical Virology*, vol. 93, no 2, fevereiro de 2021, p. 582–84. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/jmv.26406>.

MALONE, Brandon, e Elizabeth A. CAMPBELL. "Molnupiravir: Coding for Catastrophe." *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 28, nº 9, setembro de 2021, p. 706–08. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00657-8>.

Mapa da vacinação contra Covid-19 no Brasil | Vacina". G1, <https://especiais.g1.globo.com/bemestar/vacina/2021/mapa-brasil-vacina-covid/>. Acessado 29 de março de 2023.

ONKEN, Jane E., et al. "Bromelain Treatment Decreases Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines by Colon Biopsies in Vitro". *Clinical Immunology*, vol. 126, no 3, março de 2008, p. 345–52. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.11.002>.

PAIM, Adriana Alves Oliveira, et al. "Will a Little Change Do You Good? A Putative Role of Polymorphisms in COVID-19". *Immunology Letters*, vol. 235, julho de 2021, p. 9–14. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2021.04.005>.

PFIZER'S Novel COVID-19 Oral Antiviral Treatment Candidate Reduced Risk of Hospitalization or Death by 89% in Interim Analysis of Phase 2/3 EPIC-HR Study | Pfizer. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizers-novel-covid-19-oral-antiviral-treatment-candidate>. Acessado 14 de dezembro de 2021.

PILLAI, Krishna, et al. "A Formulation for in Situ Lysis of Mucin Secreted in Pseudomyxoma Peritonei: Dissolution of Mucinous Ascites". *International Journal of Cancer*, vol. 134, no 2, janeiro de 2014, p. 478–86. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/ijc.28380>.

POOLE, Phillippa, et al. "Mucolytic Agents versus Placebo for Chronic Bronchitis or Chronic Obstructive Pulmonary Disease". *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no 5, 2019. www.cochranelibrary.com, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001287.pub6>.

REYES, Aaron Z., et al. "Anti-Inflammatory Therapy for COVID-19 Infection: The Case for Colchicine". *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 80, nº 5, maio de 2021, p. 550–57. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219174>.

RITCHIE, Hannah, et al. "Coronavirus Pandemic (COVID-19)". *Our World in Data*, março de 2020. ourworldindata.org, <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.

SAGAR, Satish, et al. "Bromelain Inhibits SARS-CoV-2 Infection in VeroE6 Cells". *bioRxiv*, setembro de 2020, p. 2020.09.16.297366. PubMed Central, <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.297366>.

SAMUDRALA, Pavan Kumar, et al. "Virology, Pathogenesis, Diagnosis and in-Line Treatment of COVID-19". *European Journal of Pharmacology*, vol. 883, setembro de 2020, p. 173375. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173375>.

SANTUS, Pierachille, et al. "Oxidative Stress and Respiratory System: Pharmacological and Clinical Reappraisal of N-Acetylcysteine". *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 11, no 6, dezembro de 2014, p. 705–17. Taylor and Francis+NEJM, <https://doi.org/10.3109/15412555.2014.898040>.

SCHLEGEL, Andreas, et al. "Semliki Forest Virus Envelope Proteins Function as Proton Channels". *Bioscience Reports*, vol. 11, no 5, outubro de 1991, p. 243–55. Springer Link, <https://doi.org/10.1007/BF01127500>.

SECOR, Eric R., et al. "Bromelain Limits Airway Inflammation in an Ovalbumin-Induced Murine Model of Established Asthma". *Alternative Therapies in Health and medicine*, vol. 18, no 5, 2012, p. 9–17.

SECOR, Eric R., et al. "Oral Bromelain Attenuates Inflammation in an Ovalbumin-Induced Murine Model of Asthma". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, dezembro de 2006, p. 61–69. www.hindawi.com, <https://doi.org/10.1093/ecam/nel110>.

SMET, Annemieke, et al. "A Dynamic Mucin MRNA Signature Associates with COVID-19 Disease Presentation and Severity". *JCI Insight*, vol. 6, nº 19, outubro de 2021, p. e151777. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151777>.

STASI, Cristina, et al. "Treatment for COVID-19: An Overview". *European Journal of Pharmacology*, vol. 889, dezembro de 2020, p. 173644. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173644>.

TABAN, E. M., e G. A. RICHARDS. "Observational Study of Therapeutic Bronchoscopy in Critical Hypoxaemic Ventilated Patients with COVID-19 at Mediclinic Midstream Private Hospital in Pretoria, South Africa". *African Journal of Thoracic and Critical Care Medicine*, vol. 26, no 4, 2020. PubMed, <https://doi.org/10.7196/AJTCCM.2020.v26i4.119>.

The RECOVERY Collaborative Group. “Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19”. *New England Journal of Medicine*, vol. 384, nº 8, fevereiro de 2021, p. 693–704. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436>.

TOMAIUOLO, Giovanna, et al. “A New Method to Improve the Clinical Evaluation of Cystic Fibrosis Patients by Mucus Viscoelastic Properties”. *PLOS ONE*, vol. 9, no 1, janeiro de 2014, p. e82297. PLoS Journals, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082297>.

TYSNES, Berit B., et al. “Bromelain Reversibly Inhibits Invasive Properties of Glioma Cells”. *Neoplasia*, vol. 3, no 6, janeiro de 2001, p. 469–79. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900196>.

VALLE, S. J., et al. “A Novel Treatment of Bromelain and Acetylcysteine (BromAc) in Patients with Peritoneal Mucinous Tumours: A Phase I First in Man Study”. *European Journal of Surgical Oncology*, vol. 47, no 1, janeiro de 2021, p. 115–22. www.ejso.com, <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2019.10.033>.

VANDENBERG, Olivier, et al. “Considerations for Diagnostic COVID-19 Tests”. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 19, nº 3, março de 2021, p. 171–83. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>.

WANG, Yu, et al. “Sputum Characteristics and Airway Clearance Methods in Patients with Severe COVID-19”. *Medicine*, vol. 99, no 46, novembro de 2020, p. e23257. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023257>.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>. Acessado 29 de março de 2023.

WILES, Samuel, et al. “Endotracheal Tube Obstruction Among Patients Mechanically Ventilated for ARDS Due to COVID-19: A Case Series”. *Journal of Intensive Care Medicine*, vol. 36, no 5, maio de 2021, p. 604–11. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1177/0885066620981891>.

WILK, Aaron J., et al. "A Single-Cell Atlas of the Peripheral Immune Response in Patients with Severe COVID-19". *Nature Medicine*, vol. 26, no 7, julho de 2020, p. 1070–76. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y>.

YOUSEFI, Hassan, et al. "Repurposing Existing Drugs for the Treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 Infection: A Review Describing Drug Mechanisms of Action". *Biochemical Pharmacology*, vol. 183, janeiro de 2021, p. 114296. PubMed, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114296>.

ZHANG, Yong-Zhen, e Edward C. Holmes. "A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2". *Cell*, vol. 181, nº 2, abril de 2020, p. 223–27. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>.

ZHANG, Yun-yu, et al. "The Comparative Immunological Characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 Coronavirus Infections". *Frontiers in Immunology*, vol. 11, agosto de 2020, p. 2033. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02033>.

ZHOU, Peng, et al. "A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin." *Nature*, vol. 579, nº 7798, março de 2020, p. 270–73. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

ZHOU, Yu-Wen, et al. "Therapeutic Targets and Interventional Strategies in COVID-19: Mechanisms and Clinical Studies". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, nº 1, dezembro de 2021, p. 317. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00733-x>.

ZHU, Na, et al. "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019". *New England Journal of Medicine*, vol. 382, nº 8, fevereiro de 2020, p. 727–33. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

9. ANEXOS

I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de consentimento Livre esclarecido

TCLE

Trata-se de um estudo que vai avaliar alterações na secreção respiratória, chamada de aspirado traqueal, de pessoas internadas no centro de atendimento intensivo sob intubação com possível diagnóstico de COVID-19 e amostras de sangue de pacientes no CTI e internados em enfermarias do Hospital Risoleta Tolentino Neves.

O objetivo desse estudo é tentar desenvolver métodos e Biomarcadores para entender a infecção causada por SARS-CoV-2 que é nova para todos nós e verificar a imunidade que confere proteção contra COVID-19. Pretendemos também avaliar alterações que podem indicar um curso clínico desfavorável e a necessidade de terapias mais cuidadosas.

O estudo trata de coleta de informações pessoais e clínicas *a posteriori*, coleta de amostra de sangue e do aspirado traqueal de forma a manter a rotina hospitalar do paciente. Este é um estudo longitudinal que coletará amostras de sangue e aspirado traqueal em tempos diferentes durante a internação (0, 7 e 14 dias). A coleta de sangue será feita após alta (30, 60, 90 e 120 dias) para acompanhar os pacientes na convalescência. Nenhuma intervenção adicional será realizada. O voluntário pode retirar sua participação a qualquer momento do estudo e suas amostras guardadas em biorrepositório, valendo a partir da data deste termo.

Este estudo é importante para que se possa conhecer um pouco mais sobre efeitos da COVID-19, uma doença nova de um novo vírus, o SARS-CoV-2, que todos conhecemos muito pouco ainda. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter uma informação para indicar ou não tratamentos aos seus pacientes. Os procedimentos do estudo serão coletas de informações relativas à estado geral de saúde, dados epidemiológicos e a coleta de sangue de rotina e do aspirado traqueal, conforme indicação médica.

A coleta de sangue pode levar a um risco mínimo e um leve desconforto ao paciente, no entanto, esta apresenta-se como rotina de laboratório e será monitorada pelos responsáveis pela pesquisa. Espera-se que a pessoa tenha risco mínimo por participar neste estudo, uma vez que não envolve nenhuma intervenção adicional no paciente, só o que está previsto na rotina, sendo que as amostras dos pacientes serão guardadas no laboratório para estudos futuros. A informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

Como o resultado do estudo pode ser de seu interesse, se você quiser, pode deixar registrado além de seu próprio telefone, endereço e e-mail, os telefones e endereços de cinco contatos seus (entre eles três parentes de primeiro grau) a fim de que você possa ser encontrado para saber os resultados, mesmo após alguns anos do término desse estudo. ***A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.***

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com a coordenadora do estudo, a Dra. Jordana Coelho dos Reis, pelo telefone 31 3409-2746, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, campus Pampulha - CEP:31270-901 ou a Dr. Camila Pacheco Silveira Martins da Mata, pelo telefone 31 3459-3272, no Hospital Risoleta Tolentino Neves, Rua das Gabirobas, 01 - Vila Clóris. Belo Horizonte/MG - Brasil. Cep:31.744-012.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder.

Belo Horizonte, ____ de _____, 20__.

Assinatura do Paciente