UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MICROBIOLOGIA APLICADA

MESTRADO PROFISSIONAL

Linziane Lopes Ferreira

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO BromAc® PARA O TRATAMENTO DA COVID-19

Belo Horizonte – MG

2023

Linziane Lopes Ferreira

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO BromAc® PARA O TRATAMENTO DA COVID-19

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana G. A. Coelho dos Reis – UFMG

Coorientador: Dr. Erik Vinicius de Sousa Reis - UFMG

Belo Horizonte – MG

2023

043 Ferreira, Linziane Lopes.
Avaliação da atividade antiviral do BromAc ® para o tratamento da Covid-19 [manuscrito] / Linziane Lopes Ferreira. – 2023.
70 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Jordana G. A. Coelho dos Reis. Coorientador: Dr. Erik Vinicius de Sousa Reis.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Covid-19. 3. Betacoronavirus. 4. Acetilcisteína. 5. Bromelaínas. I. Reis, Jordana Grazziela Alves Coelho dos. II. Reis, Erik Vinicius de Sousa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 2680

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

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE

LINZIANE LOPES FERREIRA MATRÍCULA 2021728190

Às 09 horas do dia 25 de setembro de 2023, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da UFMG, a Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO BromAc ® PARA O TRATAMENTO DA COVID-19**", como requisito final para obtenção do GRAU MESTRE em MICROBIOLOGIA, área de concentração Microbiologia Aplicada. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Elisabeth Neumann, subcoordenadora do Curso, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Jordana Grazziela Alves Coelho do Reis, ICB, UFMG – orientadora	APROVADA
Dra. Estefânia Nascimento Martins, CNEM/CDTN	APROVADA
Dra. Thalita Souza Arantes, FAMINAS, BH	APROVADA

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, da qual foi lavrada a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Profa. Jordana Grazziela Alves Coelho do Reis

Dra. Estefânia Nascimento Martins

Dr. Erik Vinicius de Sousa Reis

Dra. Thalita Souza Arantes

Profa. Elisabeth Neumann
Subcoordenadora

Documento assinado eletronicamente por **Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 25/09/2023, às 15:31, 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 **THALITA SOUZA ARANTES, Usuário Externo**, em 26/09/2023, às 10:29, 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 **Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior**, em 26/09/2023, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Estefânia Mara do Nascimento Martins, Usuário Externo**, em 26/09/2023, às 15:38, 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 **Erik Vinicius de Sousa Reis, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 10:30, 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 **2657669** e o código CRC **E4074C7E**.

Referência: Processo nº 23072.231999/2020-41 SEI nº 2657669

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
MESTRADO PROFISSIONAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO BromAc ® PARA O TRATAMENTO DA COVID-19"
LINZIANE LOPES FERREIRA
Nº matrícula: 2021728190

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA APLICADA-MESTRADO PROFISSIONAL, área de concentração Microbiologia Aplicada, linha de pesquisa Diagnóstico Microbiológico e Epidemiologia, como requisito para a obtenção do grau de MESTRE EM MICROBIOLOGIA.

Aprovada em 25 de setembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Jordana Grazziela Alves Coelho do Reis - Orientadora

Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Erik Vinicius de Sousa Reis - Coorientador

Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Esteflânia Nascimento Martins

CNEM/CDTN

Dra. Thalita Souza Arantes

FAMINAS, BH / Faculdade de Minas

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2023

Profa. Elisabeth Neumann

Subcoordenadora

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2023.

Documento assinado eletronicamente por **Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 25/09/2023, às 15:31, 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 **THALITA SOUZA ARANTES, Usuário Externo**, em 26/09/2023, às 10:29, 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 **Elisabeth Neumann, Subcoordenador(a)**, em 26/09/2023, às 15:03, 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 **Estefânia Mara do Nascimento Martins, Usuário Externo**, em 26/09/2023, às 15:38, 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 **Erik Vinicius de Sousa Reis, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 10:29, 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 **2657784** e o código CRC **6B65E1AC**.

Referência: Processo nº 23072.231999/2020-41 SEI nº 2657784

RESUMO

A COVID-19 é um dos maiores desafios da civilização moderna e ainda não foi erradicada. O SARS-CoV-2 é um vírus que pode sofrer mutações e escapar dos anticorpos gerados pela exposição viral ou pela vacinação e, por consequência, o SARS-CoV-2 continua a ser uma ameaça eminente à saúde pública. Atualmente, não há tratamento antiviral 100% eficaz para a forma grave da COVID-19 e, embora o tratamento com dexametasona e ventilação mecânica seja o procedimento padrão para tratar a doença, alguns pacientes ainda sucumbem à infecção. A este respeito, BromAc® é uma combinação de bromelina e *N*-acetilcisteína, que tem mostrado efeito mucolíticos, bem como propriedades anti-inflamatórias robustas. Portanto, no presente estudo, realizamos análises *in vitro* e *ex vivo* para avaliar o efeito de bromelina em combinação com *N*-acetilcisteína na contenção do vírus em diferentes níveis. Os resultados indicaram a atividade virucida e dose-dependente dos compostos combinados *in vitro* na linhagem celular Vero-ACE2/TMPRSS2 infectada pela variante ômicron. Além disso, os compostos combinados reduziram o número de cópias genômicas do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de aspirado traqueal de pacientes COVID-19 gravemente doentes. O BromAc® também promoveu a clivagem da subunidade S1 da proteína *Spike* em amostras de aspirado traqueal, o que traz novas evidências da atividade antiviral em amostras de pacientes com COVID-19. Em suma, estes resultados trazem à luz a evidência da atividade antiviral *ex vivo* da combinação de bromelina e *N*-acetilcisteína, o que sugere seu potencial como uma abordagem de nebulização para o tratamento de COVID-19.

Palavras chaves: COVID-19; N-acetilcisteína; Bromelina; BromAc®; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

COVID-19 is one of the most significant challenges facing modern civilization and has not yet been eradicated. SARS-CoV-2 is a virus that can mutate and evade the antibodies generated by viral exposure or vaccination and, as a result, SARS-CoV-2 remains an imminent threat to public health. Currently, there is no 100% effective antiviral treatment for the severe form of COVID-19. Although treatment with dexamethasone and mechanical ventilation is the standard procedure for treating the disease, some patients still succumb to the infection. In this regard, BromAc® is a combination of bromelain and N-acetylcysteine, which has shown mucolytic effect and robust anti-inflammatory properties. Therefore, in the present study, we performed *in vitro* and *ex vivo* analyses to evaluate the effect of bromelain in combination with N-acetylcysteine on virus containment at different levels. The results indicated virucidal and dose-dependent activity of the combined compounds in vitro on the Vero-ACE2/TMPRSS2 cell line infected with the ômicron variant. In addition, the combined compounds reduced the number of genomic copies of SARS-CoV-2 RNA in tracheal aspirate samples from severely ill COVID-19 patients. BromAc® also promoted the cleavage of the S1 subunit of the Spike protein in tracheal aspirate samples, which brings new evidence of antiviral activity in samples from COVID-19 patients. In summary, these results bring to light evidence of ex vivo antiviral activity of the combination of bromelain and N-acetylcysteine that suggests its potential as a nebulization approach for treating COVID-19.

Keywords: COVID-19; N-Acetylcysteine; Bromelain; BromAc®; SARS-CoV-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ELEMENTOS ESTRUTURAIS DO VÍRUS, INCLUINDO A PROTEÍNA SPIKE (S), ENVELOPE (E), MEMBRANA (M) E COMPONENTES INTERNOS, COMO O RNA DE FITA SIMPLES VIRAL E A PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N), ASSIM COMO OS COMPONENTES DO GENOMA SARS-COV-2. ADAPTADO DE JAMISON ET AL.,2022.....14

FIGURA 2 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL DO SARS-COV-2 FONTE: ADAPTADO DE RIMMA ET AL., 2022. 16

FIGURA 3 LINHA DO TEMPO EMERGÊNCIA DE COVID-19 FONTE: ADAPTADO DE SCOVINO ET AL., 2022. 17

FIGURA 4 PRINCIPAIS MUTAÇÕES PRESENTES NAS VARIANTES DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2. FONTE: ADAPTADO DE SCOVINO ET AL., 2022.....18

FIGURA 5 DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DE ACORDO DADOS DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. FONTE: HTTPS://COVID19.WHO.INT/ , ACESSADO EM 29 DE AGOSTO DE 2023.....20

FIGURA 6 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CURSO CLÍNICO DA COVID-19 E PRINCIPAIS SINAIS E SINTOMAS. A FIGURA MOSTRA A CRONOLOGIA DA COVID-19 PÓS-AGUDA. FONTE: ADAPTADO DE NALBANDIAN ET.AL, 2021. 25

FIGURA 7 IMUNOPATOGÊNESE - A ENTRADA DO VÍRUS NA CÉLULA ALVO POR MEIO DA CLIVAGEM DA GLICOPROTEÍNA SPIKE NO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA 2 (ECA2). FONTE: ADAPTADO DE WIERSINGA ET AL., 2020. 26

FIGURA 8 ESQUEMA DA IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2. FONTE: ADAPTADO DE ZHANG ET AL., 2020. 28

FIGURA 9 O DIAGRAMA DE VISÃO GERAL DA INVASÃO SARS-COV-2 E A RESPOSTA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO HOSPEDEIRO. FONTE: ADAPTADO DE ZHOU, ET. AL., 2021. AS DROGAS E SEUS ALVOS CORRESPONDENTES TAMBÉM SÃO MOSTRADOS. A FIGURA REPRESENTA OS PRINCIPAIS ALVOS ESPECÍFICOS DOS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA COVID-19, TANTO

DIRECIONADO À PARTÍCULA VIRAL E SUA MULTIPLICAÇÃO NO INTERIOR DA CÉLULA DO HOSPEDEIRO COMO NA SUA RESPOSTA IMUNE. 33
FIGURA 10 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SÍTIO DE AÇÃO DO PF-07321332 E DO MOLNUPIRAVIR. FONTE: ADAPTADO DE COUZIN-FRANKEL, 2021. 35
FIGURA 11 - CITOTOXICIDADE E EFEITO VIRUCIDA DO BROMAC® EM VERO-ACE2/TMPRSS2 INFECTADOS COM VARIANTE ÔMICRON. OS GRÁFICOS SUPERIORES MOSTRAM A CITOTOXICIDADE EM VERO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (VARIANDO DE 31,25 A 250 MG/ML) DE BROMAC®. OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM GRÁFICOS DE LINHAS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO PARA CADA CONCENTRAÇÃO DE DENSIDADE ÓPTICA (ABS NM), À DIREITA, E EM PORCENTAGEM DE VIABILIDADE CELULAR (%) EM RELAÇÃO AOS CONTROLES NÃO TRATADOS, À ESQUERDA. O EFEITO VIRUCIDA DO BROMAC® INFECTADOS COM VARIANTE ÔMICRON É EXIBIDO COMO GRÁFICOS DE BARRAS REPRESENTANDO A MÉDIA E O ERRO PADRÃO PARA CÉLULAS TRATADAS COM PBS, NAC2% ISOLADAMENTE E BROMAC® A 125 E 250 MG/ML POR 30 E 60 MINUTOS. AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS FORAM REALIZADAS POR ANOVA ONEWAY E A SIGNIFICÂNCIA CONSIDERADA QUANDO P<0,05. 46
FIGURA 12 - EFEITO ANTIVIRAL DOSE-RESPOSTA DO BROMAC® EM VERO-ACE2/TMPRSS2 INFECTADOS COM VARIANTE ÔMICRON. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO GRÁFICOS DE BARRAS QUE REPRESENTAM A MÉDIA E O ERRO PADRÃO PARA CÉLULAS TRATADAS COM PBS, NAC 2% ISOLADAMENTE E BROMAC® A 125 E 250 MG/ML APÓS 48 HORAS PÓS-INFECÇÃO. AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS FORAM REALIZADAS POR ANOVA ONEWAY E A SIGNIFICÂNCIA CONSIDERADA QUANDO P<0,05. 47
FIGURA 13 – EFEITO ANTIVIRAL EX VIVO DE BROMAC® EM AMOSTRAS DE ASPIRADO TRAQUEAL INFECTADAS POR SARS-COV-2 DE PACIENTES COVID-19 GRAVEMENTE DOENTES DURANTE A ONDA DE ÔMICRON. OS RESULTADOS SÃO APRESENTADOS COMO GRÁFICOS DE GRÁFICO DE DISPERSÃO REPRESENTANDO A MÉDIA (LINHA) PARA AMOSTRAS TRATADAS COM NAC 2%

isoladamente e BromAc® a 125 e 250 mg/mL por 48 horas. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p<0,05. 49

Figura 14 – Efeito proteolítico em fragmentos de proteína Spike de BromAc® em amostras de aspirado traqueal infectadas por SARS-CoV-2 de pacientes COVID-19 gravemente doentes durante a onda de ômicron. O painel superior mostra a imagem representativa do Western Blot das amostras após o tratamento com NAC 2% isoladamente e BromAc® a 125 e 250 mg/mL por 30-50 minutos. Os resultados são exibidos como gráficos de dispersão sobrepostos por gráficos de barras que representam densidade óptica média, unidades arbitrárias de bandas quantificadas usando o software Image J. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p< 0,05. ns – não significativo. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19: Doença do Coronavírus 19

CoV- Coronavírus

CTI: Centro de Terapia Intensiva

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina 2

FMO: Falência múltipla de órgãos

IFN-γ: Interferon Gama

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL: Interleucina

IL-1β: Interleucina 1 Beta

LVBA: Laboratório de Virologia Básica e Aplicada

kDa: Kilodalton

MERS: Síndrome respiratória do Oriente Médio

mRNA: RNA mensageiro

NB3: Nível de Biossegurança 3

NSP: Proteínas não estruturais

CO2: Gás carbônico

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORFs: Fase de Leitura Aberta

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

Proteina S: Proteina *Spike*

PRRs: Receptores de Reconhecimento de Padrões

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RT-qPCR: PCR quantitativo de transcrição reversa

RBD: Domínio Receptor Obrigatório

RNA: Ácido Ribonucleico

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo

TCLE: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

TH1: Células T Auxiliar 1

TMPRSS2: Serina Protease Transmembranar Tipo 2

TNF: Fator de Necrose Tumoral

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VOC: Variantes de preocupação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11

1.1 Estrutura da partícula e multiplicação viral 13
1.2 Variantes (Alpha, Beta, Gamma, Delta e Ômicron) 16
1.3 Epidemiologia 19
1.4 Diagnóstico e aspectos clínicos 21
1.5 Imunopatogênese 25
1.6 Abordagens profiláticas e vacinas 30
1.7 Abordagens terapêuticas para COVID -19 32
1.8 BromAc® 35

2. JUSTIFICATIVA 37

3. OBJETIVO GERAL 39

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39

4. MATERIAL E MÉTODOS 40

4.1 Bromelina e *N*-acetilcisteína 40
4.2 Amostras de pacientes 40
4.3 Amostras de SARS-CoV-2 40
4.4 Cultura de células e reagentes 41
4.5 Ensaios de citotoxicidade 41
4.6 Ensaios antivirais 42
4.7 Extração de RNA e RT-qPCR 42
4.8 Western Blot 43
4.9 Análise dos dados 44

5. RESULTADOS 45

5.1 Avaliação da citotoxicidade em células Vero (CCL-81) e da atividade virucida anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc®. 45
5.2 Avaliação do efeito atividade antiviral dose-resposta anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc® em células Vero-ACE2/TMPRSS2 em ensaios de placa de lise viral. 47
5.3 Avaliação do impacto do BromAc® no número de cópias genômicas virais em amostras de aspirado traqueal infectadas com SARS-CoV-2. 48
5.4 Avaliação do impacto do BromAc® nas concentrações da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 frente a infecção em amostras de aspirado traqueal por Western blot. 49

6. DISCUSSÃO 52

7. CONCLUSÃO 56

8. REFERÊNCIAS 57

9. ANEXOS 65

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, muitos casos de pneumonia sem causa detectada foram atribuídos a um grupo de pessoas que trabalharam ou frequentaram um mercado de frutos do mar em Wuhan, província de Hubei na China. Após um estudo que utilizou amostras de lavados bronco-alveolares dos pacientes descobriu-se um vírus até então desconhecido. Utilizando células epiteliais infectadas do sistema respiratório e por meio do método de RT-qPCR isolado um novo coronavírus, denominado 2019-nCoV, posteriormente denominado SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*), agente causador de uma enfermidade denominada, COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), (ZHU *et al*., 2020).

Devido a gravidade e aos níveis alarmantes de disseminação do vírus em todo mundo, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou pandemia da COVID-19 (OMS, 2020). Com o aumento do número de ocorrências, novas variantes e epidemias que aconteceram anteriormente, tudo leva a crer que os Coronavírus correspondem a uma grande ameaça global, pois se propagam com muita facilidade, surgem inesperadamente e podem levar a impactos até então incalculáveis (LI *et al*., 2020).

O surto da COVID-19, causada pelo novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave SARS-CoV-2, representou e representa um dos maiores desafios da civilização moderna após a sua rápida propagação a nível pandêmico, e ainda não foi erradicada. O vírus SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavírus,* subgênero *Sarbecovirus,* associado 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. O SARS-CoV-2 é altamente transmissível**,** capaz de mutar e escapar de respostas imunes humorais geradas pela exposição viral ou vacinação e, portanto, novas variantes de

preocupação (VOC) permanecem como uma ameaça eminente à saúde pública, (VAN *et al.*, 2021).

O desfecho da doença da COVID-19 é heterogêneo. A maioria dos pacientes infectados desenvolve cursos leves ou assintomáticos da doença, enquanto um grupo considerável, devido a uma complexa interação entre múltiplos mecanismos fisiopatológicos, acaba em quadros mais graves, que vão desde pneumonia ou síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) até falência múltipla de órgãos (FMO)**,** (VAN *et al.*, 2021). Devido aos sintomas variados e ao grande número de infecções e mortes causadas pela COVID-19, é extremamente importante estudar abordagens alternativas para conter os impactos futuros da doença na sociedade.

Atualmente, a estratégia para a gestão inclui medidas preventivas e de vacinação para controlar a disseminação do SARS-CoV-2. Não há tratamento antiviral 100% eficaz disponível para a forma grave da COVID-19 e, embora os cuidados de suporte com dexametasona e ventilação mecânica sejam o procedimento padrão para tratar a doença, muitos pacientes ainda sucumbem à infecção. Considerando que o desenvolvimento de drogas anti-SARS-CoV-2 específicas leva tempo, muitos estudos se concentraram no reposicionamento de drogas para encontrar alternativas que pudessem controlar eficientemente o curso clínico da doença e a disseminação do vírus (VAN *et al.*, 2021).

O desenvolvimento científico é a maior arma para enfrentar a COVID-19, portanto, é de extrema importância incentivar e aprimorar a pesquisa e o estudo sobre a COVID-19 possibilitando o aperfeiçoamento de vacinas e o desenvolvimento de fármacos antivirais para o tratamento precoce, até então escasso.

1.1 Estrutura da partícula e multiplicação viral

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, RNA de polaridade positiva e diâmetro médio aproximado de 120 nm. A análise filogenética revelou que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado com coronavírus semelhantes aos coronavírus de morcegos e compartilha menor semelhança com SARS-CoV e MERS-CoV. Como em outros coronavírus, o seu envelope lipídico contém uma proteína *Spike* (S), uma proteína de membrana (M) e uma proteína envelope (E). A proteína *Spike* apresenta-se como um trímero, com três pontas na porção S1 de ligação ao receptor apoiadas a uma cauda representada pela porção S2 de fusão de membrana trimérica e está associada à penetração do vírus na célula, essa proteína medeia a ligação viral ao receptor da membrana da celula hospedeira. A proteína M e a proteína E auxiliam na montagem e formação da uma nova partícula viral. A proteína do nucleocapsídeo (N) forma o cerne do vírion, que envolve o RNA genômico viral (BARRETO-VIEIRA *et al*., 2021). Dois terços do genoma do vírus, estão as *Open Reading Frames* (ORFs) 1a e 1b, que são traduzidas nas poliproteínas pp1a e pp1ab. As poliproteínas pp1a/pp1ab são processadas auto-proteoliticamente para gerar dezesseis proteínas não estruturais (NSP), (JAMISON *et al*., 2022). Demonstrado abaixo na **Figura 1**.

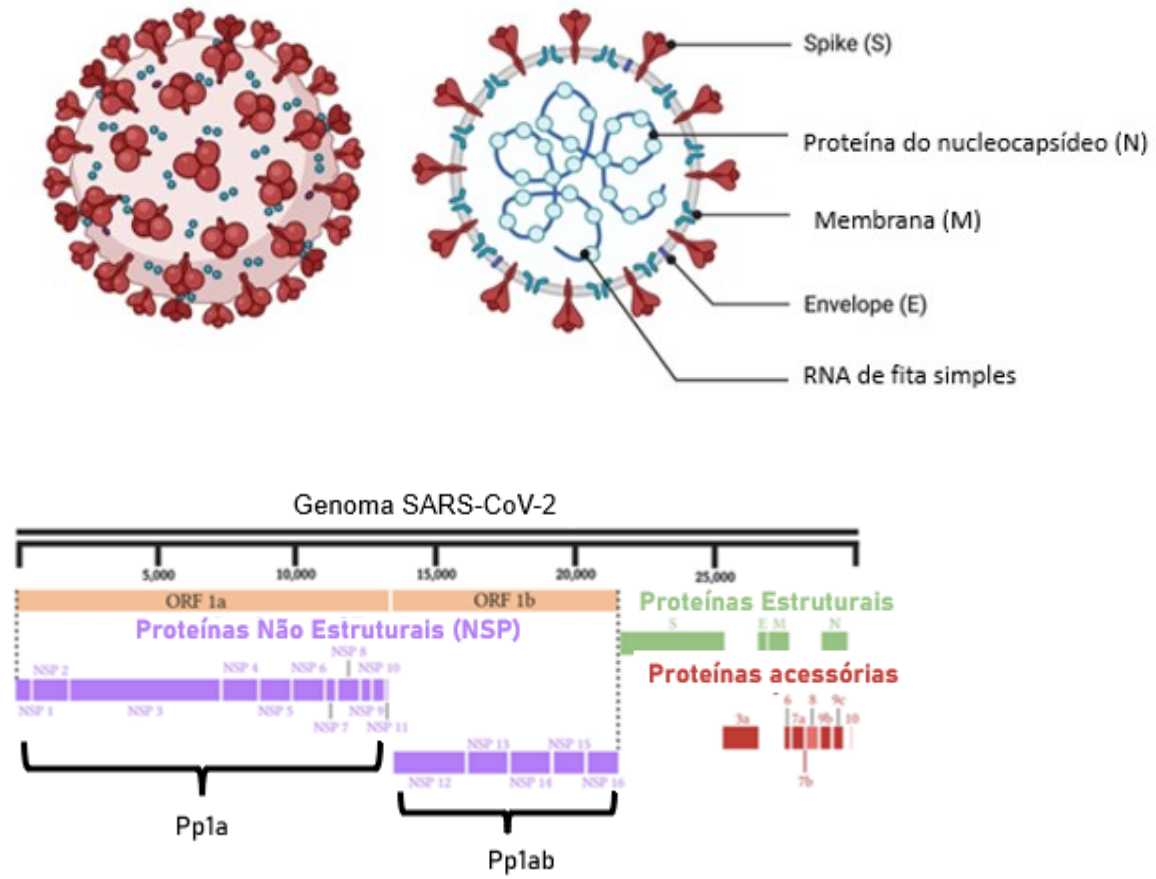


Figura 1 **-** *Elementos estruturais do vírus, incluindo a proteína Spike (S), envelope (E), membrana (M) e componentes internos, como o RNA de fita simples viral e a proteína do nucleocapsídeo (N), assim como os componentes do genoma SARS-CoV-2. Adaptado de JAMISON et al.,2022.*

O SARS-CoV-2 é capaz de infectar células do epitélio respiratório humano, penetrando nas células epiteliais nasais e brônquicas, com posterior disseminação para células endoteliais pulmonares do hospedeiro (HOFFMANN *et al*., 2020; XU *et al*., 2020; WIERSINGA *et al*., 2020).

O SARS-CoV-2, utiliza a ECA2 (enzima de conversão de angiotensina 2) como receptor celular do hospedeiro (**Figura 2**) e as proteases humanas como ativadores desta ligação. A proteína *Spike*, presente na superfície da partícula viral realiza esta interação por meio do seu domínio de ligação ao receptor, do inglês, *receptor binding domain* (RBD) o qual é ativado

proteoliticamente por proteases humanas. Após a adsorção da partícula viral à célula do hospedeiro, ocorre a clivagem da proteína *Spike*, entre as porções S1 e S2, pela ação de protease celular, Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2). Em seguida, ocorre o desnudamento do RNA no citoplasma da célula, após a liberação do genoma ele é imediatamente transcrito pela maquinaria celular, dando início a transcrição e produção das proteínas Não Estruturais (NSPs). É iniciada a síntese de RNA viral, gerando RNA genômico, que posteriormente será utilizado na montagem de novas partículas virais, e, RNA subgenômico, que atua como mRNA, como molde para tradução de proteínas estruturais e genes acessórios. Os RNA subgenômicos virais são traduzidos nas proteínas estruturais M, E e S no retículo endoplasmático rugoso, e seguem para o Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático Golgi (Ergic), sendo encaminhadas para a via secretória. Na sequência, ocorre a montagem dos vírions maduros, que posteriormente são transportados para a superfície celular, onde ocorre a liberação das partículas virais por exocitose (SHANG *et al*., 2020).

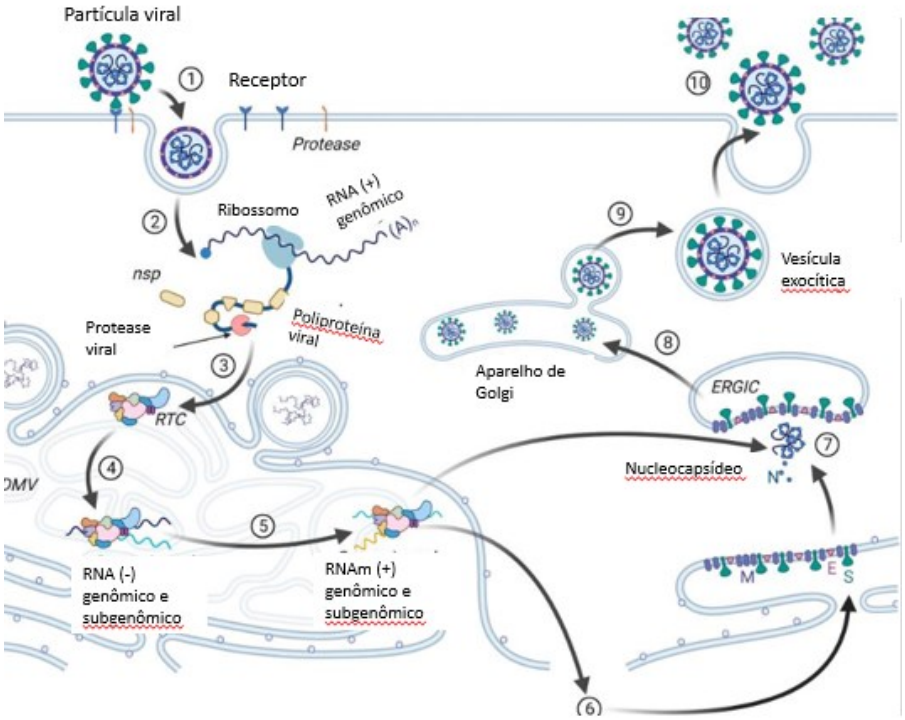


Figura 2 Ciclo de multiplicação viral do SARS-CoV-2 Fonte: Adaptado de RIMMA et al., 2022.

1.2 Variantes (Alpha, Beta, Gamma, Delta e Ômicron)

Desde o início da pandemia algumas variantes surgiram e continuam ocorrendo. A OMS, em parceria com as redes de especialistas, autoridades nacionais, instituições e investigadores, tem monitorado e avaliado a evolução do SARS-CoV-2, (SCOVINO *et al*., 2022).

As novas variantes são mais fortemente mutadas e diferenciadas por um número maior de mutações não sinônimas, principalmente na proteína *Spike* – particularmente o caso da ômicron – e propriedades fenotípicas distintas, incluindo a antigenicidade alteradas e transmissibilidade.

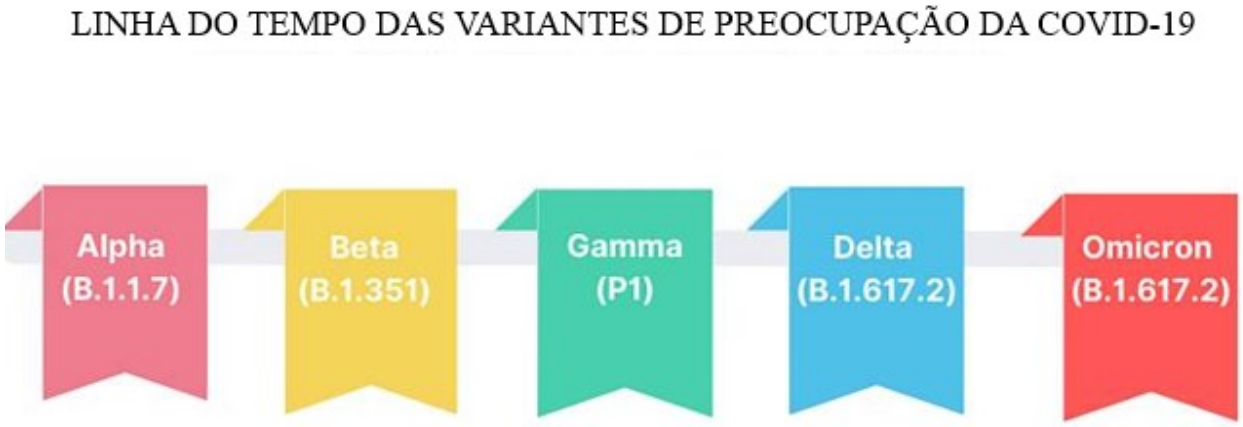


Figura 3 Linha do tempo emergência de COVID-19 Fonte: Adaptado de SCOVINO et al., 2022.

Até agora, cinco principais variantes do SARS-CoV-2 (**figura 3**) foram reconhecidas como VOC pela Organização Mundial da Saúde (e agências nacionais de saúde pública) devido à transmissibilidade aumentada ou escape imunológico. Cada variante de preocupação demonstrou vantagens de transmissão sobre as variantes anteriores e tornou-se predominante, seja regionalmente como a variante Alpha (linhagem PANGO10 B.1.1.7), Beta (B.1.351) e Gamma (P.1) — na Europa, África, Australia e América do Sul — ou globalmente, como a Delta (sublinhagens B.1.617.2/AY) e variante ômicron (B.1.1.529), (CARABELLI *et al.*, 2023)

A **figura 4** apresenta as mutações nos sítios da proteína *Spike* com o foco na região de ligação ao receptor, também denominado RBD.

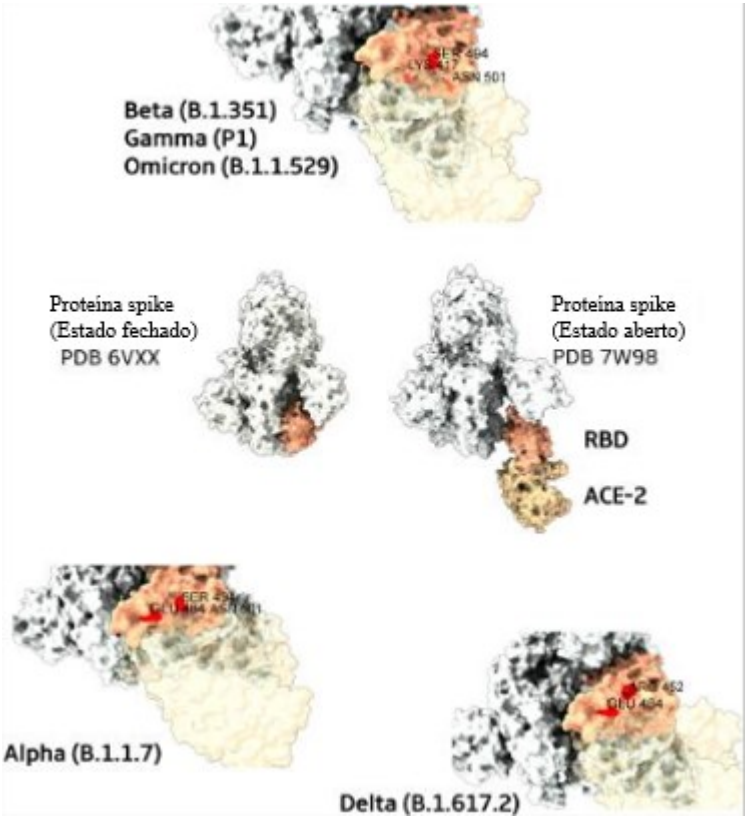


Figura 4 Principais mutações presentes nas variantes da proteína Spike do SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado de SCOVINO et al., 2022.

A variante Beta, expressa oito mutações na proteína *Spike*, afetando locais-chave da RBD associados ao escape de anticorpos neutralizantes. Não se sabe se essa combinação confere maior afinidade aos receptores ECA2 de invasão do hospedeiro. Já a variante Delta pertence à cepa B.1, que tem uma mutação na proteína *Spike* que já existe nas variantes alfa e beta, indicando que ela pode aumentar a afinidade da proteína *Spike* pelos receptores ECA2 do hospedeiro. A variante Gamma distingue da amostra original de Wuhan, apresentando doze mutações na proteína *Spike* e a variante ômicron tem algumas deleções, o que dificulta a detecção da proteína *Spike* pelo teste RT-qPCR. Esta variante apresenta mais de 30 mutações na proteína *Spike*, com cerca de 15 presentes no RDB e algumas delas em regiões que se sobrepõem às mutações das outras VOC.

Essas deleções e mutações estão associadas ao aumento da transmissibilidade por aumentar a afinidade da proteína *Spike* com a ECA2, e associadas ao escape imune do hospedeiro e à redução da neutralização dos anticorpos induzidos pela vacina (SCOVINO *et al*., 2022). Mais recentemente, houve o completo domínio das sublinhagens da ômicron (B.1.1.529/BA, como BA.1, BA.2, BA.5) (CARABELLI *et al.*, 2023). As sublinhagens de ômicron dominantes atualmente são BQ.1, XBB, BA-6 e EG.5 (CARABELLI *et al.*, 2023; OPAS, 2023). Essas variantes apresentam uma constelação de mutações observadas na proteína Spike do SARS-CoV-2.

1.3 Epidemiologia

O SARS-CoV-2 afetou mais de 200 países, resultando em mais de 500 milhões de casos identificados com mais de 6 milhões de mortes confirmadas (JHU, 2022). As primeiras manifestações da doença associada ao vírus, foram observadas em dezembro de 2019, quando um grupo de pacientes com pneumonia de causa etiológica desconhecida foram identificados em Wuhan, na China (LU, 2020).

Após o registro dos primeiros casos de infecção pelo SARS-CoV-2 na China, o vírus se espalhou rapidamente, foram registrados 11.821 casos e 259 óbitos nos primeiros 30 dias, e ainda neste período de janeiro de 2020, já havia sido confirmados casos da doença em outros países da Europa, América do Norte e Ásia. Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e em 11 de março de 2020 decretou a pandemia da COVID-19 (CAVALCANTE *et al*., 2020).

De acordo com o Governo Brasileiro (2020), o primeiro caso de COVID-19 no país foi registrado no dia 26 de fevereiro de 2020 em São Paulo e inúmeras ações foram implementadas a fim de conter e de mitigar o avanço da doença.

Desde o início da pandemia as Secretarias Estaduais de Saúde, coletam e disponibilizam dados de casos confirmados e de óbitos pela COVID-19. Isso permite o acompanhamento da evolução da pandemia no Brasil, a velocidade de espalhamento do vírus, e medidas populacionais de contenção ou de diminuição da velocidade de propagação (CAVALCANTE *et al*., 2020).

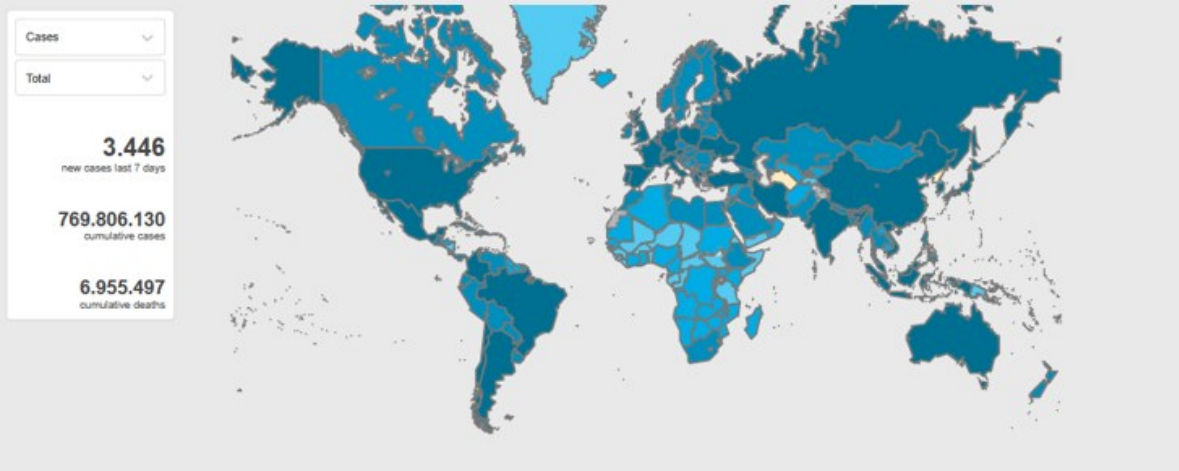


Figura 5 Distribuição global de acordo dados da Organização Mundial da Saúde. Fonte: https://covid19.who.int/ , acessado em 29 de agosto de 2023.

De acordo os dados da OMS (2023), até 16 de agosto de 2023, foram notificados 769. 806. 130 casos confirmados de COVID-19, incluindo 6.955.497 mortes. Como pode ser observado na **Figura 5**. As regiões mais afetadas são, Europa, Pacífico Ocidental, as Américas e Sudeste Asiático, e os países mais afetados são os Estados Unidos com 103.436.829 casos, China com 99.302.177 casos e Índia com 44.996.599 casos registrados.

A vacinação é fundamental para a prevenção contra formas graves da COVID-19, e junto a este sistema de vacinação, medidas de intervenção não farmacológicas, como distanciamento físico, higienização das mãos, uso de máscaras, limpeza e desinfeção de ambientes, isolamento de casos suspeitos e confirmados, constituem outras formas de prevenção e controle da COVID-19 que são fundamentais para redução e transmissão viral, aliviando assim a sobrecarga dos serviços de saúde (OMS, 2023).

1.4 Diagnóstico e aspectos clínicos

A pandemia da COVID-19 levou a enormes desafios sociais, econômicos e à saúde. Um diagnóstico acurado e rápido da infecção pelo SARS-CoV-2 é imprescindível, tanto para área epidemiológica quanto para área clínica. Dois tipos de testes diagnósticos são determinantes: um para detecção do SARS-CoV-2 o que vai indicar uma infecção aguda e uma outra análise para confirmar se houve uma infecção anterior. Outros exames também podem ser solicitados para ajudar a complementar o diagnóstico da COVID-19, como por exemplo, exames de imagem e marcadores bioquímicos. (MUNTADAS *et al*., 2021).

A reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) identifica a presença do RNA genômico por meio da amplificação do gene E, N ou RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*)) do SARS-CoV-2 em várias amostras biológicas e é considerada o teste de diagnóstico padrão-ouro. A detecção precoce por qPCR pode ser útil para controlar a fonte inicial de contaminação e evitar que novos pacientes sejam infectados pelo vírus. Detectar coronavírus rapidamente e precisamente está se tornando extremamente importante. Com avanços em ciência e, inovação, foi possível encontrar soluções para detecção viral de maneira mais rápida e eficiente de forma a

acompanhar a disseminação viral exponencial observada na pandemia. A detecção por qPCR é caracterizada como uma técnica de reconhecimento rápido, alta sensibilidade e detecção de especificidade. Vários outros testes moleculares competem para reconhecer o genoma do coronavírus, mas eles não são baseados em qPCR (VERMA *et al.,* 2021).

Os resultados da RT-qPCR não são imediatos (eles geralmente não estão disponíveis até 24-48 horas), podendo depender do atraso no transporte do centro de atendimento para o laboratório central, e em situações de colapso assistencial, o resultado pode até ser adiado em cerca de sete a 10 dias. O material biológico obtido na coleta de swab nasal deve ser processado em um laboratório central com nível de biossegurança nível dois ou superior, o que aumenta o custo desta técnica.

Desta forma, foram desenvolvidos testes rápidos (mais baratos) de antígeno que por imunocromatografia de difusão (fluxo lateral) podem apresentar resultados em amostras orofaríngeas em 15-30 minutos. Eles não necessitam de um laboratório de biossegurança e podem ser realizados no ponto habitual do atendimento ao paciente. Sua principal limitação é que, em indivíduos assintomáticos, sua sensibilidade é baixa (cerca de 50%), o que pode levar a falsos negativos. Além disso, a sensibilidade diminui se ocorrer atraso no transporte de amostra biológica para o centro de testagem, o que deve ser feito em menos de duas horas a partir da coleta da amostra. Por outro lado, a sensibilidade aumenta significativamente em pacientes sintomáticos (98,2%), porém, sua especificidade é muito alta (99,5%). A coleta da amostra biológica só pode ser realizada com swab nasofaríngeos e, sendo qualitativos, não podem quantificar o vírus presente (CASTRO-DE-ARAUJO *et al*., 2020).

Os testes de detecção de anticorpos (imunoensaios) podem informar sobre a exposição prévia ao vírus (presença de IgG) ou evidenciam uma infecção aguda (IgM). Porém, a resposta

imune específica é detectável em média 5-10 dias após a exposição ao patógeno. Por outro lado, a presença do vírus pode ser detectada até 5-6 dias do início dos sintomas e pode persistir por períodos superiores a 10 dias em pacientes com formas graves de COVID-19 (LIU *et al*., 2020). Assim, por detectarem mais precocemente as infecções, entende-se que os testes que identifiquem a presença dos antígenos do SARS-CoV-2 são muito mais úteis por poder orientar a indicação de isolamento dos indivíduos infectados, sintomáticos ou assintomáticos, contribuindo de modo expressivo para a redução da disseminação do vírus. Por outro lado, já foi especulado que a identificação de pessoas com imunidade adquirida especialmente por vacinas ou pela intensa exposição ao agente, evidenciada pela demonstração de anticorpos específicos, é da maior importância para definir medidas de suspensão progressiva de distanciamento social e retorno às atividades econômicas e sociais (CASTRO-DE-ARAUJO *et al*., 2020).

Em relação aos aspectos clínicos da infecção pelo SARS-CoV-2, Nalbandian e colaboradores (2021), caracterizam a COVID-19 como uma doença sistêmica associada a vários sinais e sintomas pulmonares e extrapulmonares. Os sintomas e anormalidades mais considerados são: fadiga, queda da qualidade de vida, fraqueza muscular, dor nas articulações, dispneia, tosse, necessidade de oxigênio persistente, ansiedade, depressão, distúrbio do sono, transtorno de estresse pós-traumático, distúrbios cognitivos, dores de cabeça, palpitações, dor no peito, tromboembolismo, doença renal crônica e queda de cabelo. Os principais mecanismos fisiopatológicos da COVID-19 agudam são: toxicidade viral direta, dano endotelial e lesão microvascular, desregulação do sistema imunológico, com estimulação de um estado hiperinflamatório, hipercoagulação com trombose *in situ*, macrotrombose e má adaptação da ECA2. Existe uma equivalência entre as sequelas pós-COVID-19 aguda com as da SARS e MERS, o que pode ser explicado pela sobreposição de identidade da sequência genômica entre os

três. Além do mais, SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 compartilham do mesmo receptor, ECA2, sendo a afinidade do SARS-CoV-2 pelo receptor maior do que a afinidade do SARS-CoV-1, supostamente resultante de alterações na proteína *Spike*. Além disso, um local adicional de clivagem S1-S2 no SARS-CoV-2 propicia uma clivagem mais eficaz por proteases do hospedeiro e, portanto, uma ligação mais eficaz. Possivelmente estes mecanismos expliquem a transmissão mais eficaz e generalizada do SARS-CoV-2 (NALBANDIAN *et al*., 2021).

A **Figura 6** mostra resumidamente o curso da doença desde a exposição do indivíduo ao vírus, passando pelo período de incubação, quando o vírus, normalmente, ainda não é identificável por meio de exames laboratoriais. Após o período de incubação, que pode ser de até 14 dias, os sintomas começam a aparecer e a partir deste momento é possível a detecção do vírus no exame. A COVID-19 pode ser dividida em várias fases: Fase aguda, período sintomático que se estende até quatro semanas e pós-aguda que é definida como sintomas persistentes e/ou complicações tardias ou de longo prazo.

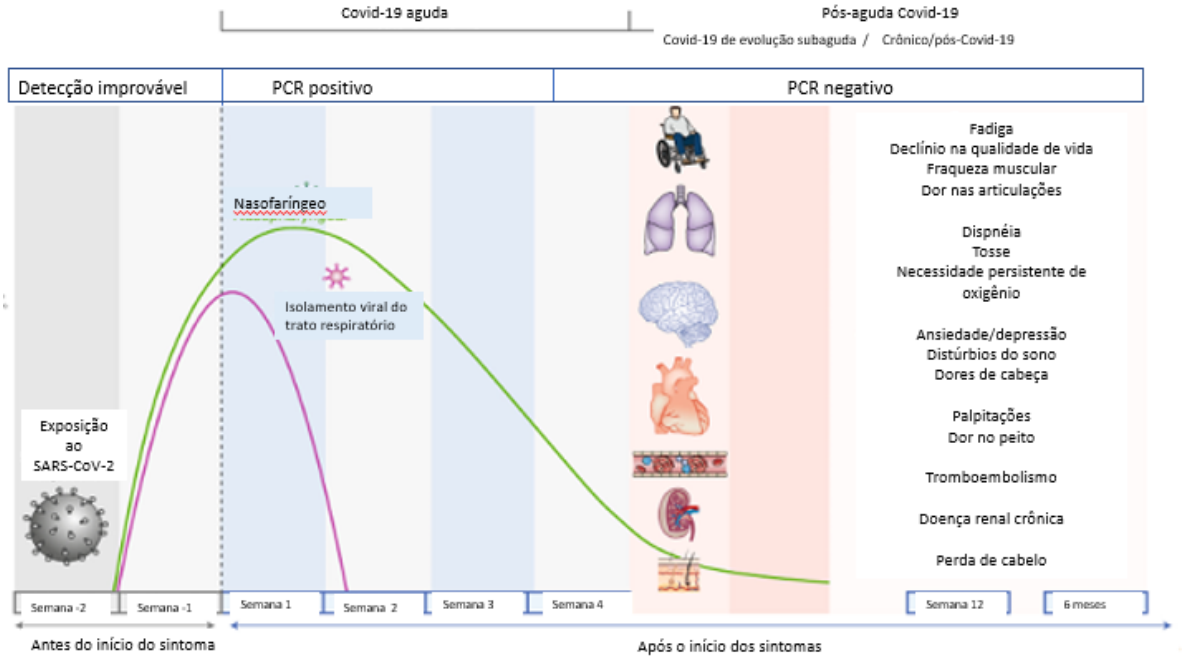


Figura 6 Representação esquemática do curso clínico da COVID-19 e principais sinais e sintomas. A figura mostra a Cronologia da COVID-19 pós-aguda. Fonte: Adaptado de NALBANDIAN et.al, 2021.

1.5 Imunopatogênese

Na fase inicial da infecção por SARS-CoV-2, em consideração a um contexto das vias aéreas, os pneumócitos do tipo II são infectados pelo vírus e liberam partículas virais, se espalhando para outras células como pneumócitos do tipo I e células endoteliais capilares. Posteriormente, ocorre uma alteração no epitélio bronco-alveolar levando ao início de uma hiper inflamação ocasionada pelo recrutamento de leucócitos do sangue periférico, (**figura 7**). Por sua vez, os leucócitos irão liberar citocinas que irão atuar como amplificadoras da inflamação do tecido pulmonar (WIERSINGA *et al*., 2020).

Posteriormente na fase tardia da COVID-19, o interstício alveolar sofre espessamento devido a infiltração das células, ocorre o aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. O epitélio bronco-alveolar comprometido nesta fase pode levar à formação de trombos no

capilar alveolar e tromboembolias. Com o agravamento dessa condição, aumenta a chance de óbito por falência múltipla de órgãos (XU *et al*., 2020; GUPTA *et al.*, 2020; WIERSINGA *et al*., 2020).

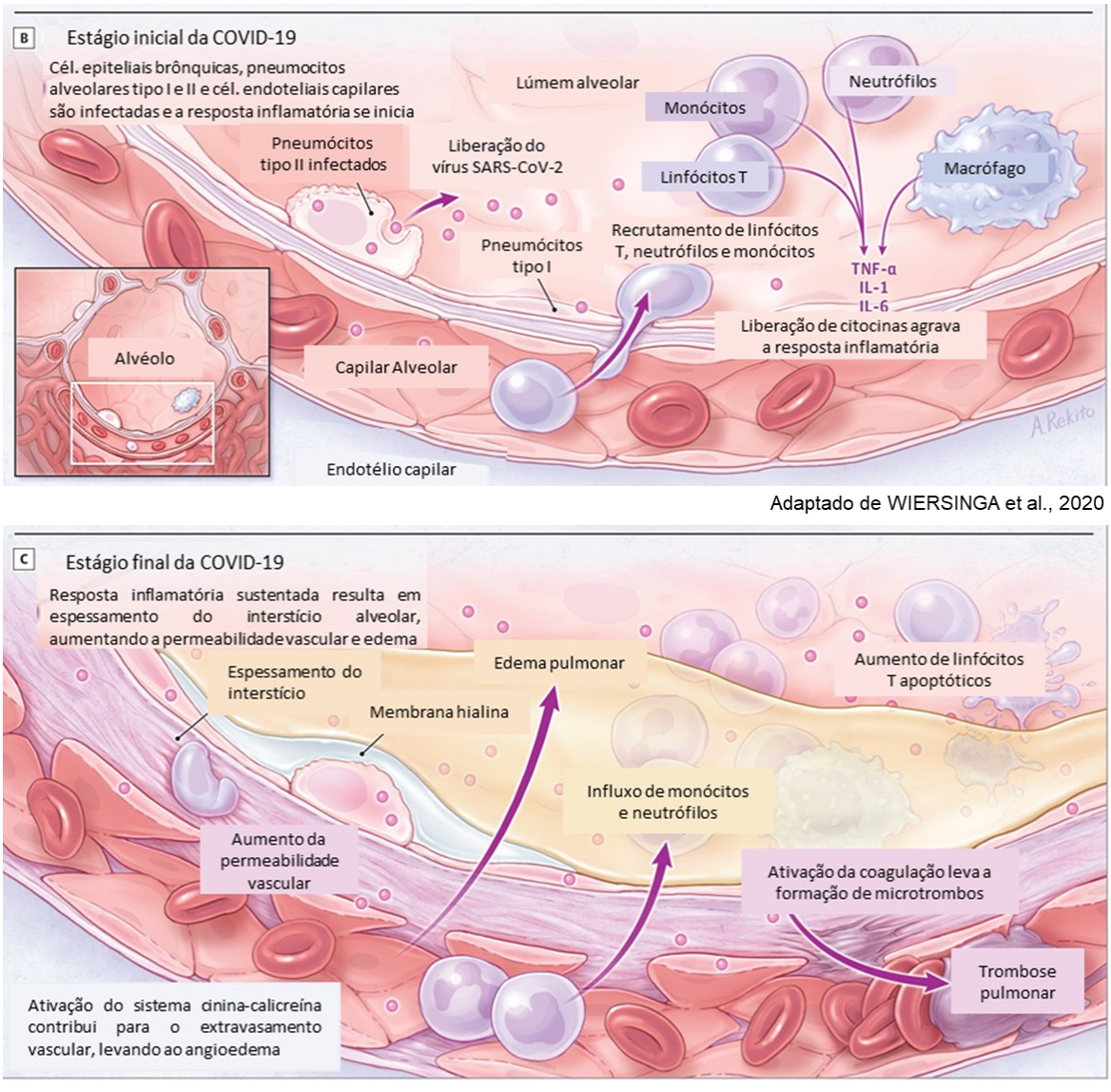


Figura 7 Imunopatogênese - A entrada do vírus na célula alvo por meio da clivagem da glicoproteína Spike no receptor de angiotensina 2 (ECA2). Fonte: Adaptado de WIERSINGA et al., 2020.

A infecção por SARS-CoV-2 leva a uma super expressão de mucinas, estimulando ainda mais o agravamento da doença. As mucinas são as defensoras da camada de muco que protege as

células epiteliais que envolvem o trato respiratório, gastrointestinal e reprodutivo contra substâncias prejudiciais. Além de ter uma função protetora, as mucinas também participam da transdução de sinal intracelular e, desempenham um papel importante na homeostase e na sobrevivência das células epiteliais. As mucinas são componentes críticos da imunidade inata, aprimorar seus perfis de expressão que ditam o curso da doença pode melhorar muito a compreensão e administração da COVID-19. Um rápido estudo que abrange aspecto da mucina sanguínea parece diferenciar COVID-19 sintomático de pacientes sem doença com base na expressão de MUC1, MUC2, MUC4, MUC6, MUC13, MUC16 e MUC20 (SMET *et al*., 2021).

A imunopatogênese da COVID-19 em casos agudos se dá na maioria das vezes pela tempestade de citocinas (**figura 8**), essa tempestade gera um ambiente de hiperinflamação devido a uma redução de linfócitos e aumento de monócitos e macrófagos.

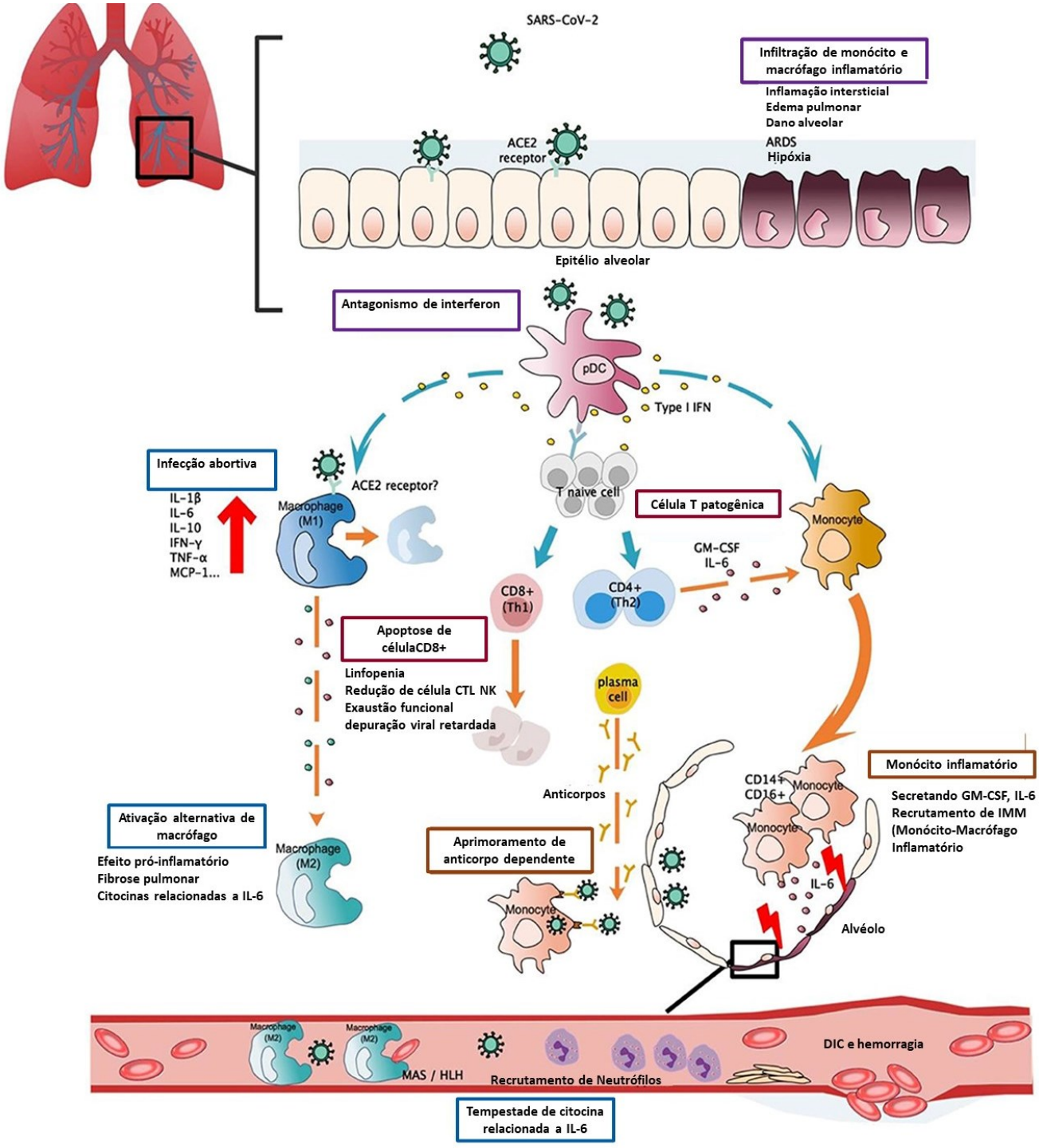


Figura 8 Esquema da imunopatogênese da infecção por SARS-CoV-2. Fonte: Adaptado de ZHANG et al.*, 2020.*

Ocorre então, ativação intracelular dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que podem identificar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como, por exemplo, dsRNA e ssRNA. Devido a identificação dos PAMPs, ocorrem respostas citolíticas pela produção de interferon (IFN) do tipo I e III e ativação de células *natural killer* (NK), além da produção de interleucinas (IL) pró-inflamatórias como TNF-alpha, interleucina 1 (IL-1), IL-6 e IL-18, (CHENG *et al*., 2020; WANG *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2020). Em conjunto, essas citocinas induzem um programa antiviral em células-alvo do vírus e promovem a resposta adaptativa ao SARS-CoV-2. (CHENG *et al*., 2020; WANG *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2020). Na resposta ao SARS-CoV-2, foi descrita uma diminuição da produção de IFN do tipo I, detectado no soro, em particular, em pacientes com prognóstico ruim (HADJADJ *et al*., 2020). Essa diminuição da produção de IFN poderia levar a uma maior carga viral e posterior hiperativação e exaustão da resposta de células T. A resposta adaptativa tem um importante papel na resolução da infecção viral pela atividade citotóxica exercida pelas células T $CD8^+$ que destroem as células infectadas, bem como pelas células T $CD4^+$ que apresentam atividade auxiliar para os linfócitos B, induzindo a produção de anticorpos específicos para o vírus, bloqueando sua penetração em células do hospedeiro (CHENG *et al*., 2020; WANG *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2020). Pacientes com infecção pelo SARS-CoV-2, em especial os pacientes mais graves, com pneumonia grave, apresentam elevação nas concentrações plasmáticas de IL-1, IL-6 e TNF-α entre outras citocinas (CHENG *et al*., 2020; WANG *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2020).

A resposta imunológica antiviral é absolutamente importante para eliminar o patógeno. Pacientes com COVID-19 apresentam níveis elevados de citocinas derivadas de linfócitos dos tipos Th1 (IL-1β e IFN-γ) e Th2 (IL-10) e, em particular, pacientes internados em CTI (Centro de

Terapia Intensiva) apresentam altas concentrações plasmáticas de IL-2, IL-7, IL-10, IL-17, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína-10 indutora de IFN-γ (IP-10), proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1α), proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) ou ligante 2 de quimiocina da família C-C (CCL2) e TNF-α quando comparados a pacientes que não necessitaram de CTI (HUANG *et al*., 2020; MEHTA *et al*., 2020).

As concentrações plasmáticas de IL-6 se encontram elevadas nas infecções graves pelo SARS-CoV-2 quando comparadas com os quadros mais brandos (MEHTA *et al*., 2020; ZHANG *et al*., 2020). Alguns autores sugeriram que uma síndrome hemofagocítica secundária poderia estar ocorrendo nos casos graves de COVID-19. Essa síndrome é caracterizada por uma tempestade de citocinas, expansão de macrófagos teciduais que apresentam expressiva atividade hemofagocítica (HUANG *et al*., 2020; MEHTA *et al*., 2020).

A elevada produção de citocinas durante a fase aguda pode levar a um agravamento do prognóstico da doença e resultar em uma inflamação sistêmica, fazendo com que a tempestade de citocinas exerça um papel patogênico em vez de protetor, em contrapartida se torna um importante alvo para desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

1.6 Abordagens profiláticas e vacinas

O SARS-CoV-2 demonstrou uma taxa superior de transmissão e foi capaz de, em cerca de seis meses, infectar mais de 10 milhões de indivíduos em vários locais do mundo, causando mais de 500 mil óbitos (RITCHIE *et al*., 2020).

Atualmente, a estratégia de gestão da COVID-19 inclui medidas preventivas e vacinação para controlar a disseminação do SARS-CoV-2. Os recursos terapêuticos para a COVID-19 são

direcionados principalmente para impedir complicações graves da doença. Neste momento, existe uma escassez de antivirais dirigidos contra o SARS-CoV-2. Há alguns autorizados para outras doenças e que apresentam boa eficácia para a COVID-19, como o Remdesivir que foi o primeiro medicamento que recebeu autorização para uso emergencial para o tratamento da COVID-19. Em casos leves a moderados, o molnupiravir e o nirmatrelvir são considerados eficientes na diminuição do risco de progressão da doença em doentes adultos não hospitalizados (VITIELLO E FERRARA *et al.*, 2021).

Para a contenção da pandemia da COVID-19 é essencial ter vacinas eficazes e seguras. De acordo a OMS as vacinas contra a COVID-19 que foram analisadas ou aprovadas para ensaios clínicos são classificadas nas seguintes categorias: vacina inativada, vacina viva atenuada, vetor, RNA, DNA, subunidade de proteína e vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLP). A opção sobre qual tipo de vacina a ser aplicada depende do tempo de avanço, custos, tempo de produção e o acesso às vacinas (HAN; ZHANG *et al*., 2022). De acordo o Ministério da Saúde (MS) as vacinas recomendadas até o momento no Brasil são: Vacina adsorvida COVID-19 (inativada) CoronaVac, a Vacina Covid-19-RNAm Comirnaty (Pfizer/Wyeth), a Vacina Covid-19-recombinante Oxford/Covishield (Fiocruz e Astrazeneca) e a Vacina Covid-19-recombinante Janssen Vaccine (Janssen-Cilag).

Até 06 de setembro de 2023, 13,5 bilhões de doses de vacina foram aplicadas em todo o mundo, segundo a *Our World In Data*, pelo menos 70,5% da população vacinada com pelo menos uma dose. No Brasil, até 02 de junho de 2023, já foram administradas 513.329.718 doses de vacina (OMS, 2023; OUR WORLD IN DATA, 2023;).

1.7 Abordagens terapêuticas para COVID -19

Desde o começo da pandemia, foram previstos múltiplos antivirais, antibióticos, antimaláricos e imunomodulatórios contra SARS-CoV-2. Contudo, outros estudos relataram utilidade clínica restringida ou inexistente para a maioria dos medicamentos propostos. Entretanto, a identificação de agentes ineficazes é de grande importância, para que tanto o tratamento adequado quanto o eficaz seja aplicado, e possíveis efeitos colaterais indesejados do tratamento sejam evitados. (DROZDZAL *et al*., 2021).

As abordagens tradicionais para descoberta de novas drogas são demoradas devido aos requisitos regulatórios para avaliar a segurança e a eficácia do medicamento, o tempo necessário para desenvolver uma nova droga leva em média de uma a duas décadas.

Atualmente, acredita-se que dois cursos principais impulsionem a patogênese da COVID-19. No estágio inicial da progressão da infecção, é impulsionada principalmente nas fases do ciclo de multiplicação viral, que é principalmente modulado por proteínas virais e no estágio final da progressão da infecção, é impulsionada por uma resposta inflamatória/imune robusta ao SARS-CoV-2 que resulta em danos teciduais. Assim, tanto as proteínas do vírus quanto os fatores hospedeiros são essenciais para a patogênese do SARS-CoV-2 e estão prometendo potenciais alvos para a terapia antiviral (**Figura 9**) (ZHOU *et al*., 2021).

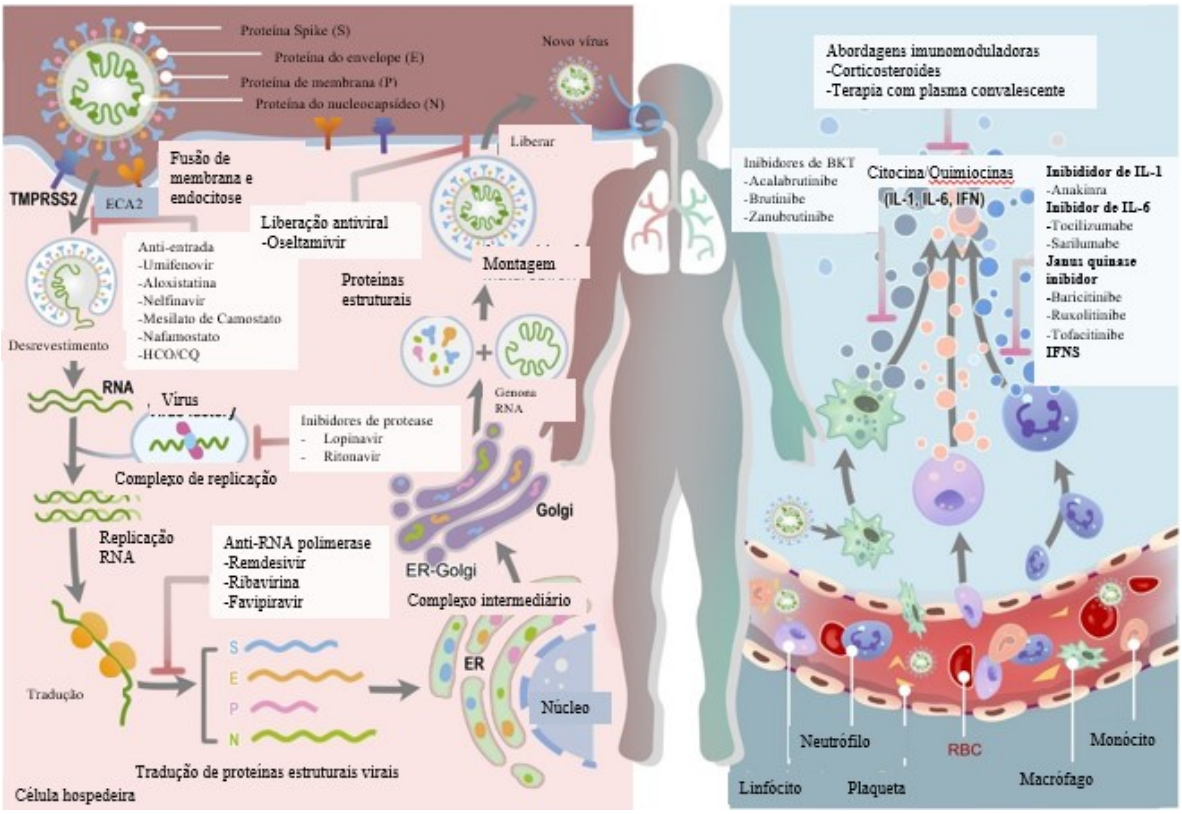


Figura 9 O diagrama de visão geral da invasão SARS-CoV-2 e a resposta do sistema imunológico hospedeiro. Fonte: Adaptado de ZHOU, et. al., 2021. As drogas e seus alvos correspondentes também são mostrados. A figura representa os principais alvos específicos dos fármacos utilizados no tratamento da COVID-19, tanto direcionado à partícula viral e sua multiplicação no interior da célula do hospedeiro como na sua resposta imune.

Partindo deste princípio, a principal classe de fármacos utilizados ou testados contra a COVID-19 são os antivirais que vão atuar diretamente na partícula viral ou em alguma fase do seu ciclo de multiplicação, impedindo, desta forma, sua reprodução no hospedeiro. Os antivirais utilizados já são eficientes contra outros vírus e estão sendo reposicionados na tentativa de combater a COVID-19 (ZHOU, et. al., 2021).

Durante a fase inicial da infecção, para que ocorra a multiplicação viral é necessário que a estrutura do vírus esteja íntegra e suas proteínas estejam com suas funções normais.

Em outubro de 2021, a Merck e a Ridgeback Biotherapeutics apresentaram o Molnupiravir, um antiviral para o tratamento da COVID-19. Os dados mostraram que o

medicamento reduziu pela metade as hospitalizações em voluntários do estudo. O mecanismo de ação é antiviral, porém, diferente do Remdesivir, os alvos de ação não são as proteases virais e sim a RdRp. Ele desestabiliza a multiplicação do SARS-CoV-2 fazendo com que o composto seja incorporado em suas informações genéticas. O que se teme em relação a este tipo de medicamento é que, a longo prazo, o uso generalizado possa promover a origem e evolução de novas variantes prejudiciais, além da preocupação e dúvida em relação à possibilidade de a droga promover a mutação nas células do hospedeiro (COUZIN-FRANKEL, 2021).

E em novembro de 2021 foram divulgados dados relacionados ao uso de um fármaco capaz de reduzir em 89% as hospitalizações por COVID-19 em pessoas tratadas dentro de três dias após o aparecimento de sintomas e aproximadamente o mesmo percentual naqueles que iniciaram o tratamento cinco dias após início de sintomas. É um antiviral, inibidor de protease, produzido pela Pfizer, chamado PF-07321332. O comunicado veio na mesma semana em que a Merck & Co. teve a aprovação, no Reino Unido, de um tratamento antiviral, oral, Molnupiravir. A **Figura 10** mostra um modelo do sítio de ação da PF-07321332 como um inibidor de protease viral e do Molnupiravir que é um análogo de nucleotídeo que vai interferir a atividade da RdRp viral no momento de replicação do genoma viral, sendo incorporado na fita nascente de RNA genômico, o que resultará na formação de vírus defectivos.

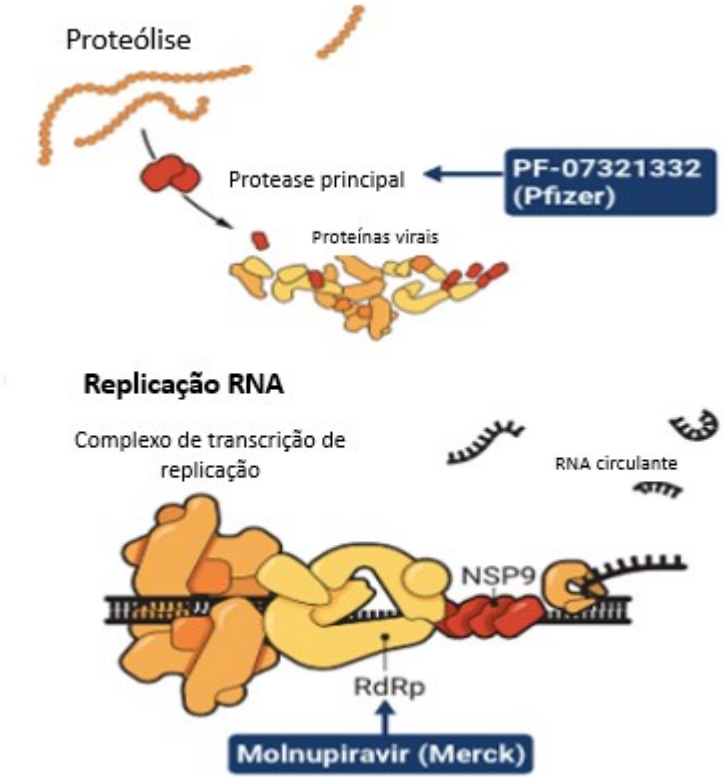


Figura 10 Representação esquemática do sítio de ação do PF-07321332 e do Molnupiravir. Fonte: Adaptado de COUZIN-FRANKEL, 2021.

A COVID-19 grave é causada pela intensa resposta do hospedeiro associada às interações vírus-hospedeiro, consequentemente os compostos de estudo que são utilizados para o tratamento precisam atuar de acordo com estes mecanismos tanto de multiplicação viral quanto da resposta imune.

1.8 **BromAc®**

Desenvolvido por pesquisadores do grupo MucPharm, BromAc® é uma combinação de Bromelina e N-acetilcisteína, capaz de promover a clivagem e perda de conformação terciária da glicoproteína *Spike*, o que torna esse agente uma estratégia atrativa por sua promissora atividade

antiviral. 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 bromelina é extraída da planta do abacaxi (*Ananas comosus*) e contém uma série de enzimas que permitem a hidrólise de ligações glicosídicas em carboidratos, enquanto a *N*-acetilcisteína é um poderoso antioxidante que pode romper as ligações dissulfeto das proteínas **(**PILLAI *et al.*, 2014**).** A combinação de ambos os compostos (BromAc®) apresenta um efeito mucolítico sinérgico que é usado para o tratamento de um tumor mucinoso raro, pseudomixoma peritoneal, **(**PILLAI *et al.*, 2014**)** e demonstrou um efeito mucolítico robusto, bem como propriedades anti-inflamatórias em aspirados traqueais de pacientes COVID-19 gravemente doentes **(**COELHO DOS REIS *et al.*, 2022**).**

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 é um dos maiores fenômenos sanitários vividos pela sociedade moderna. Apesar da existência de várias vacinas para reduzir a gravidade e mortes pela doença, ainda permanecem escassas as estratégias terapêuticas para o rápido reestabelecimento dos pacientes com COVID-19 grave, que podem permanecer no CTI por meses, colapsando o sistema de saúde com ausência de leitos. Várias tentativas em produzir terapia antiviral de ação direta específica segura e eficiente foram criadas, no entanto, elas apresentam baixo custo-efetividade. As alternativas atuais como remdesivir (injetável), molnupiravir (oral) e paxlovid (oral) apresentam eficácia e aprovação pelos órgãos regulatórios sanitários, no entanto apresentam custo elevado e proibitivo para países em desenvolvimento. Mais importante, estudos focados em drogas que são administradas nas vias aéreas para agir mais rapidamente no local-alvo ainda são escassos. A este respeito, BromAc® é composto por uma combinação de bromelina e *N*-acetilcisteína, duas drogas proteolíticas (ALDINI *et al*., 2021) que serão estudadas como um agente de reposicionamento para tratar COVID-19 (TALLEI *et al*., 2021). Além disso, o BromAc® é atualmente usado para o tratamento do raro tumor altamente mucinoso pseudomixoma peritoneu. Portanto, o BromAc® combina a capacidade de quebrar as ligações peptídicas da estrutura dos aminoácidos da mucina, juntamente com a ruptura das ligações dissulfeto (SS) entre as cadeias laterais de carboidratos, causando hidrólise de glicoproteínas. Essa combinação atua como um agente bioquímico capaz de destruir a glicoproteína *Spike*, o que torna o BromAc® uma estratégia atrativa para promover a atividade antiviral local. *In vitro*, inibiu sinergicamente a infectividade de duas linhagens de SARS-CoV-2 cultivadas em células Vero, BGM e CALU-3, apresentando um efeito antiviral de redução de 4-log (AKHTER *et al.*, 2021).

Diante das evidências da atividade anti-*Spike* do BromAc® e contando com uma constelação de mutações nas proteínas *Spike* testaremos a ação do BromAc® na variante ômicron em busca de novas evidências da ação do composto.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar da atividade antiviral anti-SARS-CoV-2 *in vitro* e *ex vivo* do BromAc®

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antiviral virucida anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc® em células Vero-ACE2/TMPRSS2 em ensaios de placa de lise viral.
- Avaliar a atividade antiviral dose-resposta anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc® em células Vero-ACE2/TMPRSS2 em ensaios de placa de lise viral.
- Avaliar o impacto do BromAc® no número de cópias genômicas virais em amostras de aspirado traqueal infectadas com SARS-CoV-2.
- Avaliar impacto do BromAc® nas concentrações de *Spike* do SARS-CoV-2 frente a infecção em amostras de aspirado traqueal por Western Blot.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bromelina e *N*-acetilcisteína

Bromelina estéril liofilizada (Mucpharm, Austrália) foi ressuspensa em solução salina tamponada com fosfato e alíquotas foram armazenadas a -20°C. Injeção de acetilcisteína (NAC) na dose de 200 mg/mL e armazenada a 4ºC. BromAc® é uma combinação de NAC 2% (20 mg/mL) e bromelina (10 mg/mL) usada em diferentes concentrações 125 e 250 μg/mL.

4.2 Amostras de pacientes

Amostras de aspirado traqueal (AT) (2-10 mL) foram coletadas durante a rotina de pacientes com COVID-19 (n = 20) com idade entre 18-80 anos sob ventilação mecânica na unidade de terapia intensiva do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN) da UFMG. Essas amostras foram aspiradas em coletores de secreção traqueal estéreis e, posteriormente processadas em laboratório de nível 3 de biossegurança. Essas amostras foram tratadas com BromAc® e, em seguida, incubadas a 37°C por 30 min. Posteriormente, foram realizadas técnicas de western blot e RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Institucional (Parecer nº: 45919121.6.0000.5526). Houve consentimento por escrito dos parentes mais próximos em nome dos pacientes para participação na pesquisa. Este estudo seguiu os princípios da Declaração D de Helsinque, bem como a resolução #466/2012 do Ministério da Saúde do Brasil para pesquisas envolvendo seres humanos.

4.3 Amostras de SARS-CoV-2

O estoque de SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 e variante ômicron foram obtidos a partir de amostras criopreservadas (1,5 x 10^6 pfu/mL) cedidas pelo professor Edison Luiz Durigon (professor do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP).

4.4 Cultura de células e reagentes

Foram utilizadas células Vero (CCL-81) e Vero-ACE2/TMPRSS2 (*Cercopithecus aethiops*, macaco verde africano) cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), 100 unidades/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e puromicina 2 µg/mL (Gibco, EUA) para a Vero-ACE2/TMPRSS2, mantidas em incubadora umidificada a 37ºC a 5% CO_2.

Os experimentos foram realizados nos laboratórios Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA/ICB/UFMG), bem como no laboratório de nível de biossegurança 2 e 3 do ICB/UFMG.

4.5 Ensaios de citotoxicidade

Células Vero (CCL-81) foram previamente cultivadas em placa de 96 poços e expostas às diferentes concentrações de BromAc® (31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL) e seus controles, mantidas em incubadora umidificada a 37ºC a 5% CO_2 por um período de 24 h, 48 h e 72 h. Em seguida a viabilidade celular foi obtida pela reação de alamarBlue® (Thermo Fischer Scientific) na concentração de 10% e em um volume final de 200 µL por poço. A reação foi realizada no escuro, por 4 horas de incubação e a leitura realizada em espectrofotômetro a 577 nm de absorbância.

4.6 Ensaios antivirais

Foram realizados ensaios virucidas e dose-resposta. Para o ensaio virucida, 200 µL do vírus foram incubados com 200 µL do composto correspondente (controle MEM, PBS 1X, NAC 2%, BromAc® 125 e BromAc® 250 µg/mL), o conteúdo foi vortexado e as amostras foram incubadas a 37ºC por 30 e 60 minutos, em seguida, foram tituladas por dose infecciosa em cultura de tecidos ($TCID_{50}$).

Para o ensaio dose-resposta, 1 x 10^5 células Vero-ACE 2/TMPRSS2 por poços foram semeadas e incubadas por 24 h 37°C/5% CO_2. No dia seguinte, as células foram contadas, e uma infecção foi realizada com MOI 0,1 de SARS-CoV-2 ômicron. Após 1 h de adsorção, o inóculo foi lavado uma vez com PBS 1X e os respectivos compostos foram adicionados: (1) PBS 1X; (2) NAC 2%; (3) BromAc® 125 µg/mL; e (4) 250 µg/mL. Esses compostos foram incubados com as células por 48 horas pós-infecção (hpi) e o sobrenadante foi titulado por $TCID_{50}$.

4.7 Extração de RNA e RT-qPCR

Os sobrenadantes dos aspirados traqueais foram submetidos à extração de RNA e RT-qPCR, a partir de protocolos padronizados para o enfrentamento da COVID-19 e utilizados no diagnóstico de SARS-CoV-2. Suscintamente, 40 µl do sobrenadante foi adicionado a 100 µl de AVL (solução de transporte e inativação viral) e armazenado em ultrafreezer a -80ºC até a extração. O RNA foi extraído de acordo com a orientação do fabricante usando o kit NucleoSpin RNA Vírus (MACHEREY-NAGEL) e as amostras armazenadas a -80ºC. A RT-qPCR foi

realizada a partir do Kit Molecular SARS-CoV-2 (E+RP) aprovado para uso emergencial da Bio-Manguinhos/FIOCRUZ (96 reações). Os iniciadores e sondas do Kit são do Protocolo de Berlim (Cormam VM *et al*., 2020). O equipamento utilizado nas etapas de amplificação e detecção foi o QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, USA).

4.8 Western Blot

Foram realizadas extrações de proteína com amostras de aspirado traqueal (AT) infectadas com SARS-CoV-2 na presença e ausência de BromAc®. O Western Blot foi realizado com quatro amostras (do mesmo paciente), incluindo 1- Não tratado; 2- NAC; 3- BromAc® 125 µg/mL; e 4 - BromAc® 250 µg/mL. As proteínas foram extraídas utilizando o protocolo M-PER™ (Reagente de Extração de Proteínas de Mamíferos- Thermo Scientific, EUA) e a quantificação das proteínas foram determinadas pelo método de Bradford™ (Bio-Rad, EUA), utilizando albumina de soro bovino (BSA -Fitzgerald 30-AB70) e leitura da absorbância. A quantidade de proteínas foi calculada e a concentração foi obtida. Foram preparados dois géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com 12% de gel de separação e 5% de gel de empilhamento, logo após, as bandas proteicas de cada gel foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,2 µm (BIO-Rad Laboratories). O bloqueio foi realizado com a solução de lavagem (TBS Twenn 1X) e leite em pó 5%, durante 1 hora. Em seguida, as membranas de PVDF foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-Sars-CoV-2-*Spike* (1:4000, SAB4200873, SIGMA) e incubadas durante 2 horas com anticorpo secundário IgG de coelho (1:5000, ab6721, Abcam).

As bandas das proteínas foram analisadas utilizando o reagente de quimiluminescência melhorada (ECL) (Clarity™ Western ECL Substrate) (BIO-Rad, EUA) e visualizadas com um sistema de imagiologia, ChemiDoc (BIO-Rad).

4.9 Análise dos dados

Os valores de metade da concentração inibitória máxima (IC_{50}) para cada composto foi calculado usando análises de regressão não linear com o *software* GraphPad Prism 9.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados são dados como médias ± DP de n experimentos. Se apropriado, valores IC_{50} foi calculado a partir de uma equação logística sigmoidal ajustada à concentração-resposta dados por análise de regressão não linear iterativa (Prism; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para comparação dos valores médios, o teste *t* bicaudal (para dados não pareados) ou teste *t* de Welch (em caso de variâncias desiguais) foi usado. O nível mínimo de significância será de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

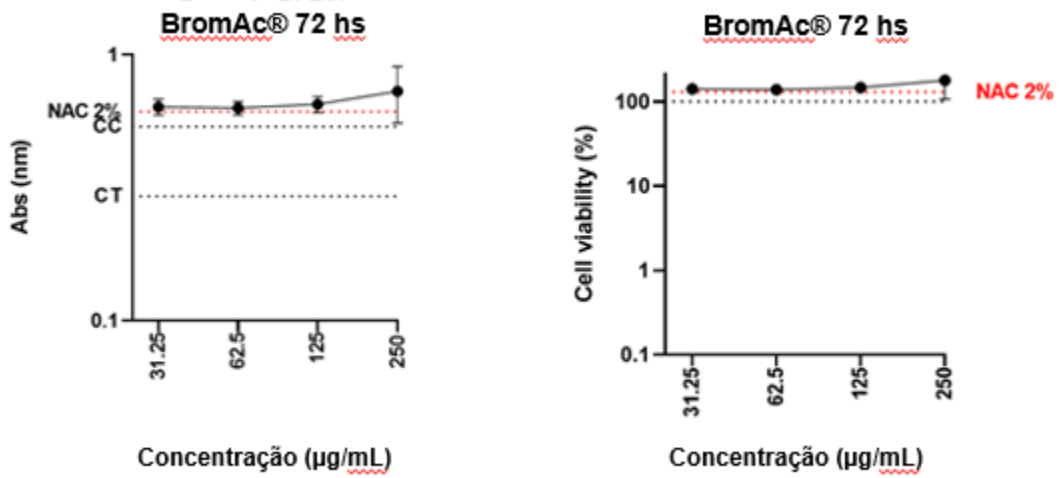
5.1 Avaliação da citotoxicidade em células Vero (CCL-81) e da atividade virucida anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc®.

Para determinar qual concentração de BromAc® seria citotóxica para células Vero, realizamos um ensaio de alamarBlue™. As células foram incubadas por até 72 horas na presença de três concentrações de BromAc®: 62,5, 125 e 250 μg/mL e comparadas com o veículo controle (PBS 1X).

Os resultados mostram que as três concentrações foram seguras para as células, apresentando viabilidade e absorbância acima de 100% em relação ao controle celular (**figura 11**), indicando que essas concentrações podem ser utilizadas para os próximos passos.

Posteriormente, devido aos melhores resultados, as concentrações mais elevadas (125 e 250 μg/mL) foram selecionadas para o teste virucida, no qual, avalia a ação do composto diretamente na partícula viral. Nesse teste, os vírus foram incubados juntamente com o composto nas concentrações pré-selecionadas, além do controle (somente MEM), controle de veículo (PBS 1X) e NAC 2% por 30 e 60 minutos a 37°C e o conteúdo foi titulado.

Após os 30 minutos, os dados mostraram que não houve diferença significativa entre PBS 1X em relação a maior concentração de BromAc® (250 μg/mL). Curiosamente, após 60 minutos de incubação, as duas concentrações de BromAc® diminuíram o número de partículas infecciosas da variante ômicron, com BromAc® 250 μg/mL diminuindo quase 1,5 log em comparação com PBS. No entanto, NAC 2% também teve um efeito diminuído contra as partículas, indicando que o possível efeito virucida poderia ser devido à atividade NAC (**figura 11**).



Efeito virucida de NAC e BromAc® em Vero-ACE2/TMPRSS2 infectado com Ômicron

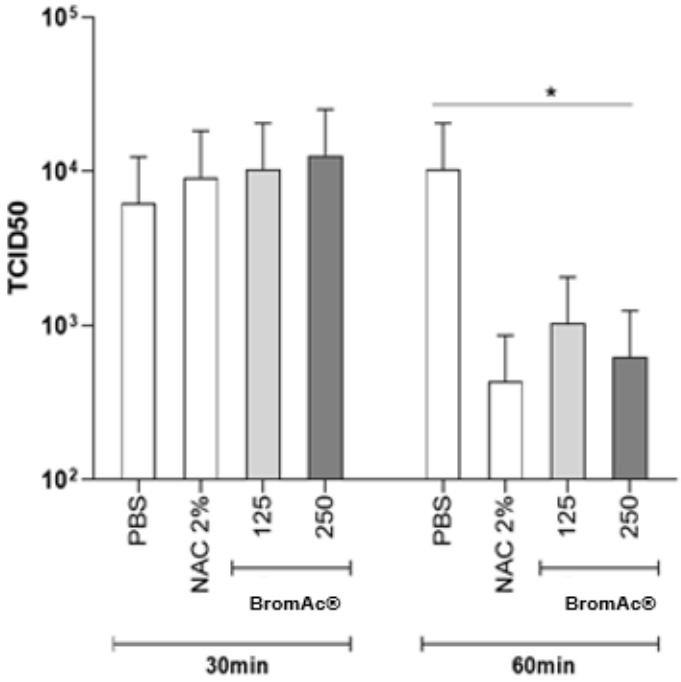


Figura 11 - Citotoxicidade e efeito virucida do BromAc® em Vero-ACE2/TMPRSS2 infectados com variante ômicron. Os gráficos superiores mostram a citotoxicidade em Vero em diferentes concentrações (variando de 31,25 a 250 µg/mL) de BromAc®. Os resultados são expressos em gráficos de linhas com média e erro padrão para cada concentração de densidade óptica (Abs nm), à direita, e em porcentagem de viabilidade celular (%) em relação aos controles não tratados, à esquerda. O efeito virucida do BromAc® infectados com variante ômicron é exibido como gráficos de barras representando a média e o erro padrão para células tratadas com PBS, NAC2% isoladamente e

BromAc® a 125 e 250 µg/mL por 30 e 60 minutos. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p<0,05.

5.2 Avaliação do efeito atividade antiviral dose-resposta anti-SARS-CoV-2 *in vitro* do BromAc® em células Vero-ACE2/TMPRSS2 em ensaios de placa de lise viral.

Para observar se o BromAc® teria uma atividade em diferentes concentrações e se ele age de forma dose-dependente, foi realizado um ensaio dose-resposta. Duas concentrações de BromAc® (125 e 250 µg/mL) foram incubadas após infecção das células com a variante ômicron em MOI de 0,1 para 48 hpi. Surpreendentemente, os dados mostraram que a maior concentração de BromAc® reduziu estatisticamente em 1 log ($p < 0,0002$) o número de partículas infecciosas, um resultado melhor do que NAC 2% que não teve efeito em comparação com o controle PBS (**figura 12**).

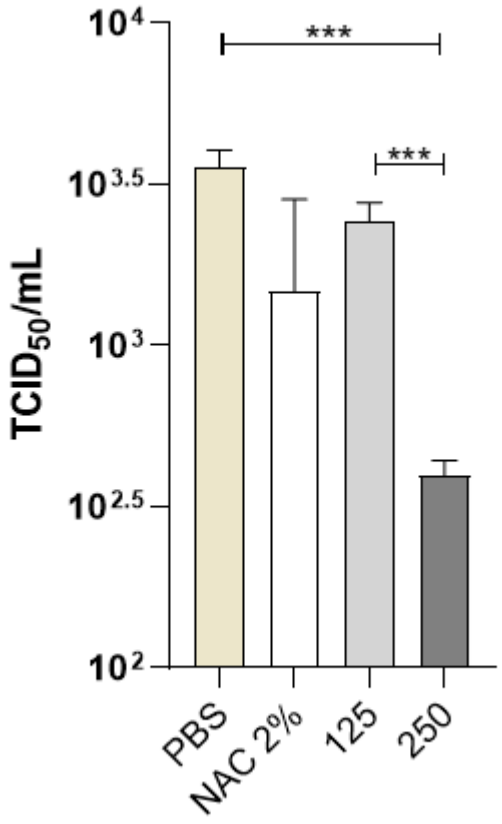


Figura 12 - Efeito antiviral dose-resposta do BromAc® em Vero-ACE2/TMPRSS2 infectados com variante ômicron. Os resultados são apresentados como gráficos de barras que representam a média e o erro padrão para células

tratadas com PBS, NAC 2% isoladamente e BromAc® a 125 e 250 µg/mL após 48 horas pós-infecção. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p<0,05.

5.3 Avaliação do impacto do BromAc® no número de cópias genômicas virais em amostras de aspirado traqueal infectadas com SARS-CoV-2.

Com a finalidade de verificar se o BromAc® poderia agir na multiplicação viral em um contexto *ex vivo*, foi realizado a quantificação da carga genômica do vírus SARS-CoV-2 em amostras positivas de aspirado traqueal tratadas com a combinação em comparação com NAC 2%. Os aspirados traqueais de pacientes gravemente enfermos foram tratados durante a noite com duas concentrações de BromAc® (125 e 250 µg/mL). Após 48 horas de tratamento, os valores de delta CT representativos de cópias genômicas foram reduzidas após o tratamento com 250 µg/mL de BromAc®, no mesmo padrão de partículas virais infecciosas em um ensaio de dose-resposta. A maior concentração de BromAc® diminuiu estatisticamente ($p < 0,05$) o número de cópias genômicas do RNA do SARS-CoV-2 em comparação com NAC 2% (**figura 13**). Pontos de tempos anteriores antes de 24 horas foram incapazes de reduzir o número de cópias genômicas do RNA do SARS-CoV-2 (dados não mostrados).

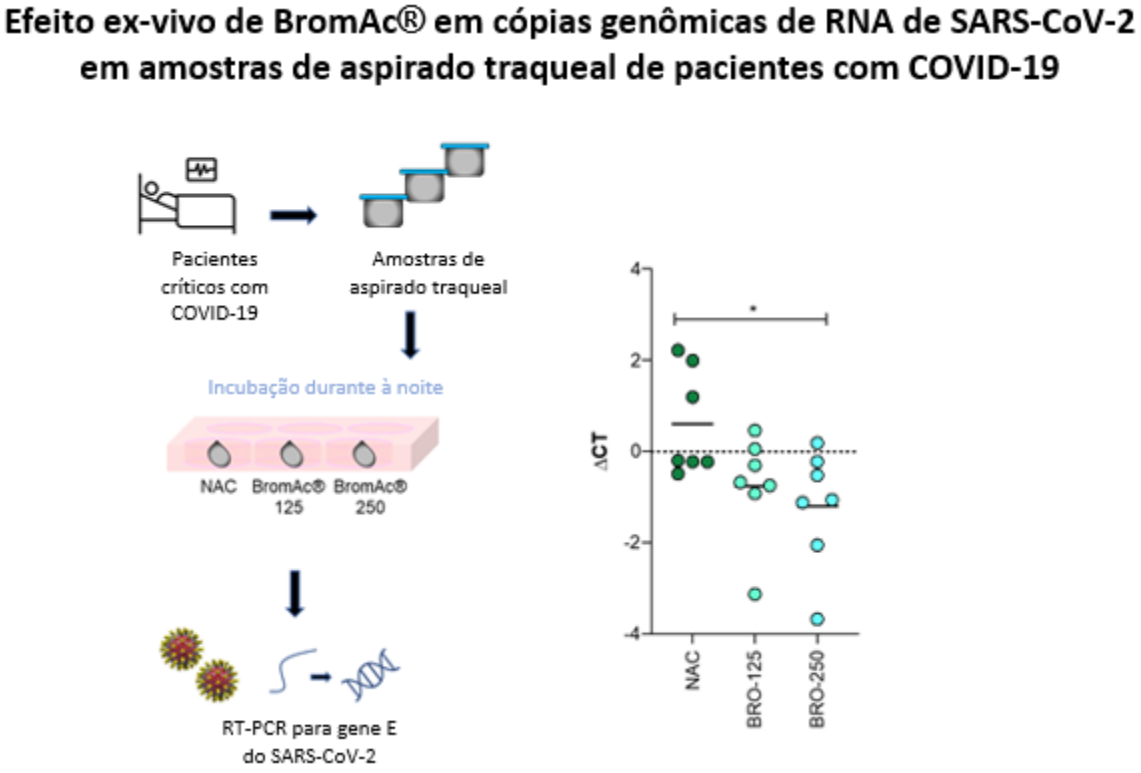


Figura 13 – Efeito antiviral ex vivo de BromAc® em amostras de aspirado traqueal infectadas por SARS-CoV-2 de pacientes COVID-19 gravemente doentes durante a onda de ômicron. Os resultados são apresentados como gráficos de gráfico de dispersão representando a média (linha) para amostras tratadas com NAC 2% isoladamente e BromAc® a 125 e 250 µg/mL por 48 horas. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p<0,05.

5.4 Avaliação do impacto do BromAc® nas concentrações da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 frente a infecção em amostras de aspirado traqueal por Western blot.

No passo seguinte, decidimos analisar a atividade proteolítica do BromAc® contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 originada de aspirados traqueais de pacientes com COVID-19 gravemente doentes. Um ensaio de western blot foi realizado com amostras de aspirado traqueal em quatro condições: (1) não tratado (NT); (2) NAC 2%; (3) BromAc® 125 µg/mL_e (4) BromAc® 250 µg/mL.

A análise de western blot permitiu a verificação de fragmentos da proteína *Spike* ao invés de toda a *Spike*. Esses fragmentos eram da porção S1 e continham domínio RBD. BromAc® clivou os fragmentos da porção S1 (~55 kDa) encontrados em amostras de aspirado traqueal após 30-50 minutos de tratamento, em comparação com amostras não tratadas. O primeiro fragmento de banda (S1) foi clivado com 100 vezes mais intensidade ($p<0,05$), tanto no tratamento de 125 μg/mL quanto no de 250 μg/mL, quase desaparecendo do blot após o tratamento com BromAc® (**figura 14, destaque em vermelho**). Adicionalmente, o número de produtos de clivagem de S e RBD (~25 kDa por banda) aumentou significativamente ($p < 0,05$) mais de 10 vezes em relação ao controle (**figura 14, destaque em azul**). Nenhuma degradação, mas sim um padrão limpo de subprodutos proteolíticos foi observado na análise de western blot, que confirmam fortemente a atividade proteolítica de BromAc® para clivagem de fragmentos da proteína *Spike* em amostras humanas de pacientes com COVID-19 grave.

BromAc® promove a clivagem da subunidade S1 *Spike* em amostras de aspirado traqueal de pacientes com COVID-19

Resultados do Western Blot

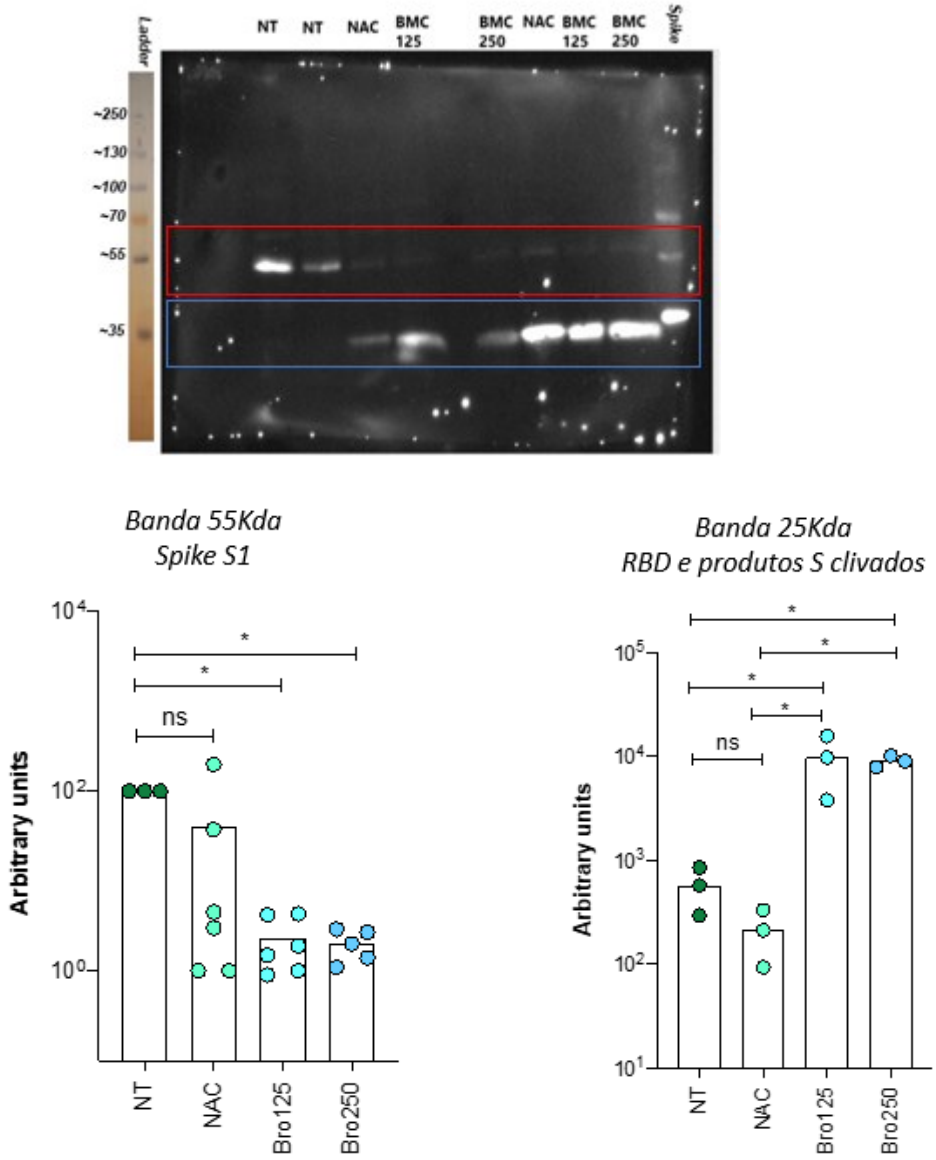


Figura 14 – Efeito proteolítico em fragmentos de proteína Spike de BromAc® em amostras de aspirado traqueal infectadas por SARS-CoV-2 de pacientes COVID-19 gravemente doentes durante a onda de ômicron. O painel superior mostra a imagem representativa do Western Blot das amostras após o tratamento com NAC 2% isoladamente e BromAc® a 125 e 250 µg/mL por 30-50 minutos. Os resultados são exibidos como gráficos de dispersão sobrepostos por gráficos de barras que representam densidade óptica média, unidades arbitrárias de bandas quantificadas usando o software Image J. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA oneway e a significância considerada quando p< 0,05. ns – não significativo

6. DISCUSSÃO

Embora a COVID-19 seja uma doença multissistêmica, a insuficiência respiratória é uma causa importante de hospitalização e morte. A patologia pulmonar na 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, (Lu et al., 2021).

Existem muitas alterações patológicas nos pulmões durante à COVID-19 e elas evoluem com o tempo. 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). Por isso a importância de estudos para o desenvolvimento de antivirais com ação específica e eficaz para o tratamento precoce e profilático contra a COVID-19.

Até o momento, o SARS-CoV-2 não tem um agente terapêutico com ação contra a sua partícula viral, desse modo o nosso trabalho teve como objetivo avaliar a atividade proteolítica antiviral do BromAc®, um composto promissor de possível ação antiviral, que também apresenta uma atividade anti-inflamatória.

A bromelina é extraída da planta do abacaxi (*Ananas comosus*) e contém uma série de enzimas que permitem a hidrólise de ligações glicosídicas em carboidratos, enquanto a N-acetilcisteína é um poderoso antioxidante que pode reduzir as ligações dissulfeto das proteínas **(**PILLAI *et al.*, 2014**).** A combinação de ambos os compostos (BromAc®) demonstrou um efeito mucolítico robusto, bem como propriedades anti-inflamatórias em aspirados traqueais de pacientes COVID-19 gravemente doentes **(**COELHO DOS REIS *et al.*, 2022**).**

Estudos demonstraram que o BromAc® inibiu sinergicamente a infectividade de duas linhagens de SARS-CoV-2 cultivadas em células Vero, BGM e CALU-3, mostrando um efeito antiviral *in vitro* **(**AKHTER *et al.*, 2021**).** No entanto, existe uma lacuna na literatura sobre quaisquer efeitos antivirais do BromAc® em amostras de aspirado traqueal e se esta atividade antiviral observada permanece conservada mesmo após a pletora de mutações que ocorreram na proteína *Spike* presentes na nova variante dominante como a linhagem da ômicron. Assim, este presente estudo, avaliou a atividade antiviral da bromelina combinada com a N-Acetilcisteína contra SARS-CoV-2 em diferentes níveis através de análise *in vitro* e *ex vivo.*

Até o momento evidências mostram que o BromAc® em uma dosagem não-citotóxica máxima 250 μg/mL, pode ser eficaz contra as partículas infecciosas do vírus e genoma da variante ômicron do SARS-CoV-2, além da atividade proteolítica na proteína *Spike* com amostras de experimento *ex vivo*.

Foi observado que a ação do BromAc® contra a partícula viral foi melhor a partir de 60 minutos (**figura 11**), essa ação poderia ser tempo-dependente, e mais experimentos poderiam ser conduzidos para descrever esse efeito. Embora a atividade de BromAc®, NAC 2% também demonstrou atividade sobre a partícula do vírus após o mesmo tempo, sendo assim, não é possível confirmar que a atividade foi devida a NAC 2% apresentada em BromAc®. NAC 2% sozinho é conhecido como um depurador de espécies reativas de oxigênio (ROS) para equilibrar o status redox, modulando a resposta imune e inflamatória, e é especulado para o uso contra SARS-CoV-2 porque seu uso contra o muco nos pulmões inibe NF-ƙB que é usado por vírus de RNA para ajudar na sua multiplicação em células hospedeiras. Além disso, NAC é sugerido por acoplamento e dinâmica molecular para se ligar no sítio M^{pro}, inibindo a multiplicação viral **(**SHNTAIF et. al., 2021**).**

Após 48 horas, em contato com as células infectadas, o BromAc® isolado de forma dose-dependente foi melhor do que NAC 2% na partícula infecciosa de ômicron (**figura 12**), corroborando com estudos anteriores ganha a ação do BromAc® contra SARS-CoV-2. Essa ação pode ser efetiva em muitas etapas do ciclo de multiplicação do vírus, mas sugerimos que a ação proteolítica do composto pode contribuir para interferir na penetração do vírus, após modificação da proteína *Spike* e da proteína do envelope (E), de acordo com Akhter e colaboradores (2021). Um trabalho mostra, por meio de acoplamento molecular e simulação dinâmica, que a bromelina poderia participar da interação de RBD e ECA2 para impedir a penetração do vírus (TALLEI *et al.,* 2021). A ação contra a proteína *Spike* poderia ser intensificada com a produção de proteínas intracelulares, uma vez que a intensa produção intracelular de *Spike* se encontra na fase de morfogênese do ciclo de multiplicação. Isso poderia então contribuir para a formação de uma progênie defeituosa, o que dificultaria a disseminação do vírus e a infecção de novas células.

Para tentar observar se a ação do composto foi antes ou depois da multiplicação, foi feito um teste de qPCR (figura 13), onde foi observado uma redução da carga genômica viral após o uso do BromAc® nas maiores concentrações. Esse efeito pode ser devido à ação do BromAc® na proteína *Spike,* interferindo na penetração ou diretamente na multiplicação. (MOHAMMED, *et al*., 2022). M^{pro} é responsável pela maior parte do processamento proteolítico da poliproteína que origina a proteína não-estrutural, responsável pelo início da replicação do genoma viral (V'KOVSKI, 2021).

A bromelina sozinha tem atividade proteolítica e é usada como anti-inflamatória, cardioprotetora e anticoagulante que pode ser útil para o tratamento de pacientes com COVID-19 (HIKISZ, *et al*., 2021). Bromelina também pode reduzir a ligação da proteína *Spike* às células Vero E6, devido à identidade do SARS-CoV-2 com outros coronavírus, a bromelina pode ser

usada como um candidato antiviral amplo contra estas famílias (SAGAR, 2020). No entanto, esses estudos são em sua maioria, baseados em abordagens *in silico*.

Confirmando o estudo anterior com a proteína *Spike* recombinante (AKHTER *et al*., 2021), os dados (**figura 14**), mostram que a porção S1 da proteína *Spike*, que é a região RBD, é clivada pelo BromAc®, confirmando a ação proteolítica sobre a *Spike*. Esse resultado pode corroborar a possibilidade de interferência na penetração do vírus, afetando o vírus nas primeiras etapas do ciclo de multiplicação.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo confirmam achados anteriores de atividade anti-*Spike* do BromAc®, o que foi evidenciado pela atividade virucida e dose-dependente do composto combinado *in vitro* na linhagem celular Vero-ACE2/TMPRSS2 infectada pela variante ômicron do SARS-CoV-2. Além disso, BromAc® reduziu o número de cópias genômicas do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de aspirado traqueal de pacientes COVID-19 gravemente doentes. O BromAc® também promoveu a clivagem da subunidade S1 da proteína *Spike* em amostras de aspirado traqueal, o que traz novas evidências da atividade antiviral em amostras de pacientes com COVID-19. Em suma, estes resultados trazem à luz a evidência da atividade antiviral *ex vivo* da combinação de bromelina e *N*-acetilcisteína, o que sugere seu potencial como uma abordagem de nebulização para o tratamento de 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.

AKHTER, J., Quéromès, *et al*. “The Combination of Bromelain and Acetylcysteine (BromAc®) Synergistically Inactivates SARS-CoV-2”. Viruses, 13(3), 425. https://doi.org/10.3390/v13030425.

ALDINI G., Altomare A., Baron G., *et al*. “N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why.” Free Radic. Res. 2018;52(7):751–762. doi: 10.1080/10715762.2018.1468564.

BARRETO-VIEIRA, D.F., *et al., “*Morphology and morphogenesis of SARS-CoV-2 in Vero-E6 cells”. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 116: e200443, 2021.

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

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.

CAI, Y., *et al*. “Distinct conformational states of SARS-CoV-2 *spike* protein”. Science (New York, N.Y.), 369(6511), 1586–1592. https://doi.org/10.1126/science.abd4251.

CARABELLI, A. M., *et al*. “*SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness.*” Nat Rev Microbiol. 2023; 21(3): 162–177. Publicado online 2023 Jan 18. DOI: 10.1038/s41579-022-00841-7

CASTRO-DE-ARAUJO, L.F.S, *et al., "*Aspectos clínicos e terapêuticos da infecção da COVID-19". Salvador/BA, 2020.

CAVALCANTE, J. R. *et al.,* "COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020". Epidemiol. Serv. Saúde vol.29 no.4 Brasília 2020 Epub 05-Ago-2020. http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742020000400010

CHENG, ZJ, Shan J. 2019 "Novel coronavirus: where we are and what we know. Infection". 2020 Apr;48(2):155-163. doi: 10.1007/s15010-020-01401-y. Epub 2020 Feb 18. Erratum in: Infection. 2021 Feb;49(1):197. PMID: 32072569; PMCID: PMC7095345.

COELHO DOS REIS, J. G. A., *et al*. "Ex-vivo mucolytic and anti-inflammatory activity of BromAc in tracheal aspirates from COVID-19". Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 148, 112753. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112753

COUZIN-FRANKEL, Jennifer. "Pfizer antiviral slashes COVID-19 hospitalizations". https://www.science.org/content/article/pfizer-antiviral-slashes-covid-19- hospitalizations. Acessado em 25 de julho de 2022.

DROŻDŻAL, S., *et al*. "An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment". Drug Resist Updat. 2021 Dec;59:100794. doi: 10.1016/j.drup.2021.100794. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34991982 PMCID: PMC8654464 DOI: 10.1016/j.drup.2021.100794

GUPTA, A., Madhavan, M.V., Sehgal, K. *et al*. "Extrapulmonary manifestations of COVID-19". Nat Med 26, 1017–1032 (2020).

HADJADJ, J., *et al.* "Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients". Science. 2020 Aug 7;369(6504):718-724. doi: 10.1126/science.abc6027. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32661059 PMCID: PMC7402632 DOI: 10.1126/science.abc6027

HAN Q., *et al*. “Long-Term Sequelae of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of One-Year Follow-Up Studies on Post-COVID Symptoms”. PMID: 35215212 PMCID: PMC8875269. DOI: 10.3390/pathogens11020269

HIKISZ P., Bernasinska-Slomczewska, J. “Beneficial Properties of Bromelain” Nutrients. 2021 Nov 29;13(12):4313. doi: 10.3390/nu13124313.

HOFFMANN, M, et. al. “SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor” Cell. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052. Epub 2020 Mar 5.

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.

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.

Johns Hopkins University (JHU). COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. 2021. Disponível em: https://coronavirus.jhu.edu/map.html. Acesso em: 03 de março de 2023.

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.

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 Hongzhou, *et al*., “Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle” J Med Virol. 2020 Apr; Published online 2020 Feb 12. DOI: 10.1002/jmv.25678

MAJUMDER, J; MINKO, T. “Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19”, Guest Editors, 2021.

MEHTA P., Fajgenbaum D.C. “ Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate”. Curr. Opin. Rheumatol. 2021 1;33(5):419–430. 10.1097/BOR.0000000000000822.

MUNTADAS, M.V., “Pruebas diagnósticas COVID-19: importancia del contexto clínico”, Espanha, Elsevier, 2021.

MOHAMMED, F A., *et al. “*Exploring the Binding Interaction of Active Compound of Pineapple against Foodborne Bacteria and Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on Molecular Docking and Simulation Studies*”.* Nutrients, 2022 Jul 25;14(15):3045. DOI: 10.3390/nu14153045.

MORENS, D.M., *et al*. “Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19”. 2020.

NALBANDIAN, A., *et al*., “Post-acute COVID-19 syndrome”. Nat Med. 2021 Apr; 27(4):601-615. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33753937

NEWS MEDICAL. **News Medical Life Sciencies**, c2020. Página inicial. Disponível em: <https://www.news-medical.net/news/20200830/SARS-CoV-2-Neucleocapside-(N)-protein-is-heavily-glycosylated.aspx>. Acesso em: 13 de jul. de 2022.

OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. https://www.paho.org/pt/noticias/23-8-2023-atualizacao-sobre-variante-interesse-eg5-e-variante-sob-vigilancia-ba286. Acessado 29 de agosto de 2023.

PILLAI, K., Akhter, J., Chua, T. C., & Morris, D. L. (2014). A formulation for in situ lysis of mucin secreted in pseudomyxoma peritonei. International journal of cancer, 134(2), 478–486. https://doi.org/10.1002/ijc.28380

QIN, C, *et al*., "Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China". Clin Infect Dis. 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248. PMID: 32161940; PMCID: PMC7108125.

RIMMA, N., *et al*. "Biology of the SARS-CoV-2 Coronavirus". Bioquímica (Mosc). 2022; 87(12-13): 1662–1678. Publicado online 2023 Jan 13. DOI: 10.1134/S0006297922120215

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

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.

SAGAR, S. *et al*. Bromelain Inhibits SARS-CoV-2 Infection in VeroE6 Cells. Biorxiv, 2020. https://doi.org/10.1101/2020.09.16.297366.

SCOVINO, M. A., *et al*. “SARS-CoV-2's Variants of Concern: A Brief Characterization” PMID: 35958548 PMCID: PMC9361785 Front Immunol. 2022 Jul 26; 13:834098. doi: 10.3389/fimmu.2022.834098. eCollection 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.834098.

SMET, A., *et al*. “A dynamic mucin mRNA signature associates with COVID-19 disease presentation and severity.” JCI Insight. 2021 Aug 27:151777. doi: 10.1172/jci.insight.151777.

SHANG, J, *et al*. “Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2” Natureza. Manuscrito do autor; disponível em PMC 2020 Sep 30. Publicado em forma final editada como: Natureza. Maio de 2020; 581(7807): 221–224. Publicado online 2020 Mar 30. DOI: 10.1038/s41586-020-2179-y.

SHARMA, A., *et al.*, COVID-19: “A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention”. 2021.

SHNTAIF, A.H., *et al*. “Determination the binding ability of N-acetyl cysteine and its derivatives with SARS-COV-2 main protease using molecular docking and molecular dynamics studies”. Ukr.Biochem.J. 2021; Volume 93, Issue 5, Sep-Oct, pp. 43-51, doi: https://doi.org/10.15407/ubj93.05.043.

TALLEI, T. E., *et al*. “An Analysis Based on Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation Study of Bromelain as Anti-SARS-CoV-2 Variants”. Front Pharmacol.2021. Aug 20; 12:717757. doi: 10.3389/fphar.2021.717757. eCollection 2021.

VAN EIJK, L. E., *et al*. “COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options”. Jornal de Patologia, 254(4), 307–331. https://doi.org/10.1002/path.5642.

VERMA, M.K., *et al., “*Rapid diagnostic methods for SARS-CoV-2 (COVID-19) detection: an evidence-based report”. India, 2021.

VITIELLO, A., *et. al*., "COVID-19 Patients with Pulmonary Fibrotic Tissue: Clinical Pharmacological Rational of Antifibrotic Therapy". SN Compr Clin Med. 2020;2 (10):1709-1712. doi: 10.1007/s42399-020-00487-7. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32875276 PMCID: PMC7452615 DOI: 10.1007/s42399-020-00487-7

V'KOVSKI , P., *et al*. "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2". Nat Rev Microbiol, 2021 Mar;19(3):155-170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.

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.0000000000023257.

WIERSINGA WJ, *et al*. "Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review". JAMA. 2020;324(8):782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839.

WHO Coronavírus (COVID-19) Dashboard. https://covid19.who.int. Acessado 16 de agosto de 2023.

Xu, Z, *et al*. "Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome". Lancet Respir Med. 2020 Apr;8(4):420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X. Epub 2020 Feb 18. Erratum in: Lancet Respir Med. 2020 Feb 25;: PMID: 32085846; PMCID: PMC7164771.

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

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 posterior*, 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 manterei uma cópia deste consentimento em meu poder.

Belo Horizonte, _____ de _____,20___.

_____

Assinatura do Paciente