

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Vinícius Amorim Beltrami

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR SELETIVO DE PDE,
ROFLUMILASTE, E COMBINAÇÕES NA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA
GRAVE INDUZIDA POR CORONAVÍRUS MURINO**

Belo Horizonte

2023

Vinícius Amorim Beltrami

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO INIBIDOR SELETIVO DE PDE,
ROFLUMILASTE, E COMBINAÇÕES NA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA
GRAVE INDUZIDA POR CORONAVÍRUS MURINO**

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

Orientadora: Profa. Dr. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Belo Horizonte

2023

043

Beltrami, Vinícius Amorim.

Avaliação do efeito do inibidor seletivo de PDE, Roflumilaste, e combinações na síndrome respiratória aguda grave induzida por coronavírus murino [manuscrito] / Vinícius Amorim Beltrami. – 2023.

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

Orientadora: Profa. Dr. Dra. Vanessa Pinho da Silva. Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski.

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

1. Biologia Celular. 2. Inibidores da Fosfodiesterase 4. 3. Coronavírus Relacionado à Síndrome Respiratória Aguda Grave. 4. COVID-19. 5. Dexametasona. I. Silva, Vanessa Pinho da. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



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

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VINÍCIUS AMORIM
BELTRAMI**

Às **quatorze horas** do dia **29 de maio de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Avaliação do efeito do inibidor seletivo de PDE, roflumilaste, e combinações na síndrome respiratória aguda grave induzida por coronavírus murino**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vanessa Pinho da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG	aprovado
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	aprovado
Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis	UFMG	aprovado
Dra. Danielle da Glória de Souza	UFMG	aprovado

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

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de maio de 2023.**

Dr^a. Vanessa Pinho da Silva (Orientadora) _____

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa (Coorientadora) _____

Dr^a. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis _____

Dr^a. Danielle da Glória de Souza _____



Documento assinado eletronicamente por **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Membro de comitê**, em 16/06/2023, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 20/06/2023, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 20/06/2023, às 20:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 06:22, 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 **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 10:32, 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 **2363399** e o código CRC **B631B37A**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família que sempre me apoiou nas minhas escolhas. Obrigado mãe e obrigado pai por aceitarem que eu seguisse meu sonho, mesmo que significasse estar tão longe de vocês. Ao meu irmão e à minha irmã agradeço os momentos que passamos juntos quando vou para Campinas nos meus dias de paz e tranquilidade que só essa cidade consegue me dar.

Agradeço à UFMG por ter me acolhido muitos anos atrás. Mudanças nunca são e nunca serão fáceis, mas ter vindo para cá e conhecido as pessoas que conheci tornou tudo mais fácil do que pensei que seria. Agradeço aos meus amigos da graduação, principalmente a Flávia, o Pedro, o Cristian e o Maycon, com quem ainda mantenho contato e que foram meu porto seguro nesta cidade durante todos esses anos. Também agradeço pelas amizades que fiz no laboratório. Aprendi muito com cada um de vocês e espero também ter ensinado algo em retribuição. Mas não foram só os aprendizados, a convivência com vocês torna uma rotina tão desgastante, como nós bem sabemos e vivemos, mais leve. Agradeço ao Celso, que foi um amigo de livros e corridas neste ano. Obrigado pela companhia e por todos ensinamentos, principalmente sobre histologia, a qual deixou de ser uma técnica que me era tão impossível. Também agradeço a Jojo pela companhia no final do ano passado. Não foi fácil, mas estar com você tornou menos difícil. À Vivi, que me acolheu nessa empreitada viral, um tema que eu nunca tinha pensado em estudar até então. Um agradecimento especial ao meu grupo de pesquisa, o LARRI. À minha orientadora Vanessa, que me acolheu no laboratório anos atrás. Está sendo uma ótima caminhada científica e fico feliz de partilhar abertamente minhas ideias e ser ouvido por você, sempre com muita atenção. Também sou grato pela sua animação e pelo seu otimismo em momentos que não consigo tê-lo no meu trabalho. À Débora G., que já compartilha o grupo comigo há alguns anos, sempre muito solícita e gentil e, me citando em meus agradecimentos do TCC, “com nossos surtos coletivos”. Ao Franciel, uma pessoa que sei que sempre posso pedir ajuda e que deixa os experimentos mais leves com sua espontaneidade. E um agradecimento mais que especial para a Ilma e para a Rose, que fazem o laboratório acontecer. Sem vocês nada disso seria possível.

Também agradeço às pessoas que conheci aqui nesta cidade e fazem parte da minha vida fora da UFMG. Seja nos rolês aleatórios com ótimos filmes de terror, em conversa no Discord ou jogando algo. Agradeço especialmente e novamente à Flávia,

minha melhor amiga, que me apresentou todos vocês direta ou indiretamente, e ao Pedro, pois ambos fazem parte da minha vida acadêmica e pessoal. Ao Douglas, Rony, Yuri, Maladeza e John Wick. Fico muito feliz de ter conhecido todos vocês ao vir para Belo Horizonte e me sinto uma pessoa sortuda pela relação de amizade que temos.

Aos meus amigos de Campinas, os quais me afastei fisicamente muitos anos atrás, mas continuo sentido o mesmo carinho por todos. Ir para Campinas e ver vocês é revisitar todos bons momentos que tive nessa cidade. É uma sensação de lar que não consigo explicar. Tenho vocês marcado na minha pele e não me arrependo nem por um segundo. Obrigado Thiago, Pedro e Luís, oficialmente marcados também. Obrigado Krisar, Neto, Terra, Davi, Melo e Daniel. Espero ver vocês o mais logo possível. Mesmo longe, contem comigo para o que precisarem.

Por fim, mas não menos importante, aos meus dois gatos, Dororo e Derere, os quais são minha dose diária de fofura e felicidade garantida.

“Achei que vocês gostariam de ver o que os anjos calçam. Só por curiosidade mesmo. Não estou tentando provar nada, a propósito. Sou um cientista e sei muito bem o que pode ser chamado de prova. Mas o motivo pelo qual desejo ser chamado pelo meu apelido de infância é exatamente esse: me lembrar de que um cientista deve, acima de tudo, ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independentemente daquilo ser o que ele imaginava ver ou não. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão, você só vai ver o que você espera ver. À maioria dos cientistas se esquece disso. Mais tarde, vou mostrar uma coisa a vocês para demonstrar o que estou falando. Então, o outro motivo pelo qual gosto de ser chamado de Wonko, o São, é para que as pessoas pensem que sou bobo. Isso me permite dizer o que eu vejo quando eu vejo. Não dá para ser um cientista se você for ficar se preocupando se as pessoas vão ou não te achar bobo. Enfim, imaginei que vocês fossem gostar de ver isso também”

RESUMO

Em 2019, surgiu um novo betacoronavírus conhecido como SARS-CoV-2, cuja infecção resultou na doença denominada COVID-19. Essa doença é caracterizada por pneumonia com infiltrado pulmonar, insuficiência respiratória aguda e sepse, podendo levar ao óbito do paciente. Diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo da patogênese da COVID-19 e para o desenvolvimento de novas terapias. A infecção de camundongos com *murine hepatitis vírus* (MHV), pertencente ao gênero dos betacoronavirus, representa um dos modelos para o estudo da COVID-19, cuja infecção induz uma doença inflamatória pulmonar que mimetiza aspectos da COVID-19 e é caracterizada por aumento de mediadores inflamatórios, acúmulo de leucócitos e dano ao tecido pulmonar. Neste estudo tivemos como objetivo avaliar os efeitos do roflumilaste, um inibidor seletivo da fosfodiesterase 4 (PDE4), enzima que degrada o AMPc, isoladamente ou combinado com a dexametasona no tratamento da inflamação pulmonar associada à infecção pelo MHV-3, um modelo murino de COVID grave, ou MHV-A59, um modelo murino de COVID leve/moderada. No modelo murino de COVID grave, animais infectados com MHV-3 e tratados terapeuticamente com 10 mg/kg de roflumilaste tiveram redução da lesão e dos níveis de CCL2 e CXCL1 no tecido pulmonar. Enquanto isso, o tratamento com 1 mg/kg de roflumilaste não teve efeito nestes parâmetros, o que sugere um efeito dose dependente do roflumilaste. A adoção de uma estratégia profilática de tratamento com roflumilaste causou piora da lesão pulmonar nos animais infectados com MHV-3, o que sugere um efeito tempo dependente para o tratamento. O tratamento combinado com 1 mg/kg de roflumilaste e 0,1 mg/kg de dexametasona, doses que não possuem eficácia na melhora da lesão pulmonar quando administradas isoladamente, reduziu a inflamação pulmonar em animais infectados com MHV-3. No modelo murino de COVID leve/moderada, animais infectados com MHV-A59 tratados terapeuticamente com 10 mg/kg de roflumilaste tiveram redução dos níveis de CCL2 e CXCL1 no tecido pulmonar e de proteínas totais no lavado broncoalveolar. Em conclusão, nós demonstramos que o tratamento com roflumilaste possui um efeito dose e tempo dependente na melhora da inflamação pulmonar induzida por MHV e que o tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona possui efeito aditivo ou sinérgico para a melhora da lesão pulmonar associada à infecção MHV.

Palavras-chave: MHV-3. MHV-A59. Inibidor de PDE4. Roflumilaste. AMPc. Dexametasona. COVID-19. Inflamação.

ABSTRACT

In 2019, a novel betacoronavirus known as SARS-CoV-2 emerged. The disease associated with SARS-CoV-2 infection, known as Corona virus disease 2019 (COVID-19), is characterized by pneumonia with pulmonary infiltrate, acute respiratory failure and sepsis, potentially resulting in severe illness and mortality. Several experimental models have been developed to investigate the pathogenesis of COVID-19 and facilitate the development of novel therapies. Infection of mice with the murine hepatitis virus (MHV), a member of the betacoronavirus genus, results in the development of an inflammatory lung disease with features similar to COVID-19, including increased inflammatory mediators, leukocyte accumulation, and lung tissue damage. In this study, our aim was to assess the effects of roflumilast, a selective phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor that degrades cAMP, either alone or in combination with dexamethasone, in treating pulmonary inflammation associated with MHV-3 infection, a severe murine model of COVID, as well as MHV-A59, a mild/moderate murine model of COVID. Animals infected with MHV-3 and therapeutically treated with 10 mg/kg of roflumilast exhibited reduced lung damage and levels of CCL2 and CXCL1. Meanwhile, therapy with 1 mg/kg of roflumilast had no effect on these parameters, indicating that roflumilast has a dose-dependent effect. Adopting a prophylactic treatment strategy with roflumilast increased lung injury in MHV-3-infected mice, indicating that roflumilast has also a time-dependent effect. The combined treatment of 1 mg/kg of roflumilast and 0.1 mg/kg of dexamethasone, doses that individually do not effectively improve lung injury, reduced lung inflammation in animals infected with MHV-3. In addition, we showed that animals infected with MHV-A59 and therapeutically treated with 10 mg/kg of roflumilast had lower levels of CCL2 and CXCL1 in lung tissue and total proteins in bronchoalveolar lavage. In conclusion, we showed that treatment with roflumilast has a dose- and time-dependent effect in alleviating MHV-induced lung inflammation, and that combining roflumilast and dexamethasone has an additive or synergistic effect in alleviating lung injury associated with MHV infection.

Keywords: MHV-3. MHV-A59. PDE4 inhibitor. Roflumilast. cAMP. Dexamethasone. COVID-19. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema experimental 1: inóculo resposta da infecção com MHV-35.....	49
Figura 2. A infecção intranasal com MHV-3 induz sinais clínicos, perda de peso e mortalidade inóculo dependente.....	50
Figura 3. Esquema experimental 2: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3...	51
Figura 4. O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz a inflamação pulmonar após a infecção com MHV-3 de modo dose dependente.....	53
Figura 5. O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz os níveis de quimiocinas pulmonares na infecção por MHV-3 de modo dose dependente.....	54
Figura 6. A infecção com MHV-3 promove o acúmulo de neutrófilos nas regiões alveolares, peribronquiolares e perivasculares do tecido pulmonar.....	56
Figura 7. O tratamento terapêutico com roflumilaste melhora as alterações hematológicas associadas à infecção com MHV-3 de maneira dose dependente.....	58
Figura 8. Esquema experimental 3: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros clínicos da infecção com MHV-3.....	59
Figura 9. O tratamento terapêutico com roflumilaste não altera parâmetros clínicos da infecção com MHV-3.....	60
Figura 10. Esquema experimental 4: avaliação do tratamento terapêutico antecipado com roflumilaste nos parâmetros pulmonares da infecção com MHV-3.....	61
Figura 11. O tratamento terapêutico antecipado com roflumilaste não altera a lesão pulmonar da infecção com MHV-3.	62
Figura 12. Esquema experimental 5: avaliação do tratamento profilático com roflumilaste nos parâmetros clínicos da infecção com MHV-3.....	63
Figura 13. O tratamento profilático com roflumilaste promove maior lesão pulmonar frente à infecção por MHV-3.....	64

Figura 14. Esquema experimental 6: avaliação do tratamento terapêutico com dexametasona nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3.....	65
Figura 15. O tratamento com dexametasona não altera a lesão pulmonar frente à infecção com MHV-3.....	67
Figura 16. O tratamento terapêutico com dexametasona recupera a linfopenia associada à infecção por MHV-3.....	68
Figura 17. Esquema experimental 7: avaliação do tratamento terapêutico combinado de roflumilaste e dexametasona nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3.....	69
Figura 18. O tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona melhora a lesão pulmonar na infecção por MHV-3.....	70
Figura 19. Esquema experimental 8: cinética da infecção com MHV-A59.....	71
Figura 20. A infecção com MHV-A59 induz sinais clínicos leves.....	72
Figura 21. A infecção com MHV-A59 induz títulos virais e lesão pulmonar autolimitados.....	73
Figura 22. A infecção com MHV-A59 induz aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas pulmonares.....	75
Figura 23. A infecção com MHV-A59 não altera a deposição de colágeno no pulmão dos animais infectados.....	76
Figura 24. A infecção com MHV-A59 promove títulos virais e lesão hepática autolimitados.....	78
Figura 25. A infecção com MHV-A59 promove alterações hematológicas.....	80
Figura 26. Esquema experimental 9: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-A59.....	81
Figura 27. Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste na lesão pulmonar da infecção com MHV-A59.....	83

Figura 28. Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste no lavado broncoalveolar de animais infectados com MHV-A59.....	84
Figura 29. O tratamento terapêutico com roflumilaste não tem efeito nos parâmetros hematológicos associados à infecção com MHV-A59.....	85
Figura 30. Efeitos dose e tempo dependentes do roflumilaste na melhora da inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-3.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - adenilato ciclase

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AnxA1 - anexina A1

CEACAM - molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário

COVID-19 - Corona virus disease 2019

CRH - do hormônio liberador de corticotrofina

DAD - lesão alveolar difusa

db-AMPc - dibutiril AMPc

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

E - envelope

ECA2- enzima conversora de angiotensina 2

Epac – exchange proteins directly activated by cAMP

ERGIC - compartimentos intermediários entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi

FDA - Food and Drug Administration

GILZ - glucocorticoid-induced leucine zipper protein

GR - receptor de glicocorticoide

HDAC2- histona deacetilase 2

HE - hemaglutinina esterase

HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

ICAM-1- molécula de adesão intercelular-1

INF - interferon

IRF-3- fator regulador 3 de interferon

JNK - janus tyrosine kinase

M - membrana

MERS-CoV - coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio

MERTK - MER tirosina quinase

MHV - vírus da hepatite murina

N - nucleocapsídeo

NET - neutrophil extracellular trap

NF- κ B - fator nuclear kappa B

NLR - razão entre neutrófilos por linfócitos

nsps - proteínas não estruturais

OMS - Organização mundial de saúde

orf - fases de leitura aberta

PDE – fosfodiesterase

PDE4 – fosfodiesterase 4

PKA - proteína quinase A

RBD - domínio de ligação ao receptor

S - espícula

SARS-CoV – coronavírus da síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 – coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

SRAG - síndrome respiratória aguda grave

TMPPRS2 - protease transmembrana tipo II

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Coronavírus.....	19
1.1.1 Classificação dos coronavírus.....	19
1.1.2 Estrutura dos coronavírus.....	20
1.1.3 Reprodução viral dos coronavírus.....	21
1.2 Imunopatologia da COVID-19.....	22
1.2.1 Alterações pulmonares da COVID-19.....	23
1.2.2 Alterações hematológicas e sistêmicas da COVID-19.....	25
1.3 Modelos pré-clínicos para o estudo da COVID-19.....	29
1.3.1 MHV como modelo de estudo para COVID-19.....	30
1.4 Tratamentos anti-inflamatórios.....	31
1.4.1 Inibidores de PDE4.....	31
1.4.1.1 Via do AMPc.....	31
1.4.1.2 Efeitos anti-inflamatórios da via do AMPc.....	32
1.4.1.3 Inibidores de PDE4 na COVID-19.....	36
1.4.2 Glicocorticoides.....	36
1.4.2.1 Via dos glicocorticoides.....	36
1.4.2.2 Efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides.....	38
1.4.2.3 Glicocorticoides na COVID-19.....	39
1.5 Terapias para o tratamento da COVID-19.....	41
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44

3.1 Declaração de ética.....	44
3.2 Células.....	44
3.3 Vírus.....	44
3.4 Titulação viral.....	44
3.5 Reagentes e drogas.....	45
3.6 Infecção in vivo por MHV-3 e MHV-A59.....	45
3.7 Tratamento com roflumilaste.....	45
3.8 Tratamento com dexametasona.....	45
3.9 Escore clínico.....	45
3.10 Coleta das amostras.....	46
3.11 Análise hematológica.....	46
3.12 Análise histológica de escore inflamatório.....	46
3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	47
3.14 Imuno-histoquímica.....	47
3.15 Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar.....	48
3.16 Análises estatísticas.....	46
4. RESULTADOS.....	49
4.1 A infecção de camundongos com MHV-3 induz sinais clínicos, perda de peso e tempo médio de sobrevivência inóculo dependente.....	49
4.2 O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz a lesão e os níveis de quimiocinas pulmonares na infecção por MHV-3 de modo dose dependente.....	51
4.3 O tratamento terapêutico com roflumilaste melhora as alterações hematológicas associadas à infecção por MHV-3.....	57
4.4 O tratamento terapêutico com roflumilaste não altera parâmetros clínicos e sobrevivência da infecção com MHV-3.....	58

4.5 A antecipação do tratamento terapêutico com roflumilaste prejudica a melhora da lesão pulmonar na infecção por MHV-3.....	60
4.6 O tratamento profilático com roflumilaste promove maior lesão pulmonar na infecção por MHV-3.....	63
4.7 O tratamento com dexametasona não altera a lesão pulmonar frente à infecção com MHV-3.....	65
4.8 O tratamento terapêutico com dexametasona recupera a linfopenia associada à infecção por MHV-3.....	68
4.9 O tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona melhora a lesão pulmonar na infecção por MHV-3.....	69
4.10 A infecção com MHV-A59 – Caracterização de um modelo de COVID-19 leve.....	71
4.11 A infecção com MHV-A59 está associada a recuperação localizada de títulos virais e lesão pulmonar autolimitada.....	72
4.12 A infecção com MHV-A59 está associada a recuperação localizada de títulos virais e lesão hepática autolimitados.....	76
4.13 A infecção com MHV-A59 induz alterações hematológicas.....	79
4.14 Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste na lesão pulmonar da infecção com MHV-A59.....	81
5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONCLUSÃO.....	95
7. PERSPECTIVAS.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças reportou casos de pneumonia na província de Wuhan. A causa deste surto permaneceu desconhecida até que, em janeiro de 2020, foi sequenciado o genoma de um novo beta coronavírus: o SARS-CoV-2 (TAN e colab., 2020). Os pacientes infectados por este vírus apresentaram manifestações abrangentes que variaram de casos assintomáticos à casos fatais. Mais comumente, em cerca de 80% dos pacientes, os sintomas foram leves, como febre, tosse, falta de ar, fadiga, dor torácica, dor de cabeça, diarreia e vômito. Entretanto, em casos mais graves, que acometeram cerca de 5% dos pacientes, foram registrados sintomas de pneumonia com infiltrado pulmonar, insuficiência respiratória aguda e sepse, podendo levar o paciente à óbito (HUANG e colab., 2020). Esta doença causada pela infecção com SARS-CoV-2 foi denominada COVID-19 (do inglês, *Corona virus disease 2019*) pela Organização mundial de saúde (OMS) em janeiro de 2020. Além dos sintomas clínicos inicialmente constatados, sequelas e lesões de caráter sistêmico da COVID-19 foram registradas com o passar dos meses e anos. Dentre elas, constam lesão renal aguda, lesão hepática, complicações cardiovasculares, como lesão miocárdica, miocardite, infarto do miocárdio e trombose, além de complicações neurológicas, como doenças cerebrovasculares e lesão na musculatura esquelética (LONG e colab., 2020; MAO, Ling e colab., 2020; MAO, Ren e colab., 2020; WIERSINGA e colab., 2020; ZHENG e colab., 2020). Atualmente, a OMS registrou 766.440.796 casos confirmados e 6.932.591 óbitos decorrentes da COVID-19.

Além da patogenicidade da COVID-19, uma característica marcante do SARS-CoV-2 é a sua capacidade de disseminação rápida. Ela se deve pelo modo de transmissão do vírus: gotículas de aerossol secretadas por pessoas infectadas, tossindo ou apenas respirando, podem ser lançadas por até 4 metros de distância e carrear partículas virais infecciosas de SARS-CoV-2 (GUO, Zhen Dong e colab., 2020). Além disso, essas partículas virais podem permanecer viáveis por até 3 horas no ar, 72 horas em superfícies como plástico e 48 horas em metais (VAN DOREMALEN e colab., 2020). Outro fator que favorece a disseminação do SARS-CoV-2 é que a sua transmissão se inicia antes da aparição dos sintomas da doença (HE e colab., 2020).

Devido à alta transmissibilidade do SARS-CoV-2, à necessidade de unidade terapia intensiva por parte dos pacientes graves e à potencial mortalidade da COVID-19, esta doença representa um grande risco para o sistema de saúde público brasileiro, podendo desencadear uma sobrecarga nos profissionais da saúde e a falta de equipamentos hospitalares suficientes para o tratamento dos infectados. Portanto, tratamentos que melhorem o quadro dos pacientes, principalmente pacientes graves, se fazem necessários. Além disso, o risco da emergência de novos surtos de infecções virais é advertido há quase duas décadas (MORENS e colab., 2004), de modo que o entendimento da interação vírus-hospedeiro e o estabelecimento de estratégias terapêuticas eficazes podem salvar milhões de vidas na ocorrência de um novo surto por coronavírus. Neste sentido, plataformas de estudo de infecções por coronavírus em laboratórios de pesquisa foram criadas. Aqui, nós nos propomos a utilizar uma destas plataformas de estudo: a infecção intranasal pelo vírus da hepatite murina (MHV, do inglês *murine hepatitis virus*), pertencente ao gênero dos betacoronavirus, compartilhado com o SARS-CoV-2, para o estudo de possíveis terapias anti-inflamatórias para a COVID-19.

1.1 Coronavírus

1.1.1 Classificação dos coronavírus

Os coronavírus são pertencentes à subfamília *Coronavirinae* da família *Coronaviridae* e da ordem *Nidovirales*. Com base nas relações filogenéticas e em diferenças na estrutura genômica, a subfamília *Coronavirinae* é dividida nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, dentre os quais apenas os alfacoronavirus e betacoronavirus infectam mamíferos (FORNI e colab., 2017). Composto as sete espécies de coronavírus que infectam seres humanos, os HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 são caracterizados por causarem infecções autolimitadas no trato respiratório superior e sintomas leves de resfriado em pacientes imunocompetentes (MONTANO, 1974). As outras três espécies, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e o SARS-CoV-2, são altamente patogênicos e provocam doença pulmonar grave e potencialmente fatal aos humanos. Em 2003, O SARS-CoV foi a causa de um surto de síndrome respiratória aguda grave na China em que mais de 8000 pessoas foram infectadas (PEIRIS e colab., 2003). Enquanto isso, no ano de 2012, o MERS-CoV foi

o agente etiológico responsável por um surto com registro de 2494 pessoas infectadas (RAJ e colab., 2014). Por sua vez, o SARS-CoV-2 é o patógeno responsável pela COVID-19, um surto que tomou proporções pandêmicas e causou a infecção e a morte de milhões de pessoas (ZHOU e colab., 2020).

Além de humanos, os coronavírus são patógenos naturais de outras espécies de mamíferos, incluindo os camundongos. Os MHV constituem um grupo de linhagens de coronavírus murinos descobertos inicialmente em 1949 (CHEEVER e DANIELS, 1949) e estudados desde então em modelos pré-clínicos de hepatite e de doenças desmielinizantes (MACPHEE e colab., 1985; SINGH e colab., 2018). Mais recentemente, com a emergência dos surtos causados por SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, modelos de estudo de infecção pulmonar vêm sendo propostos em distintas linhagens de coronavírus murinos (ANDRADE e colab., 2021; DE ALBUQUERQUE e colab., 2006; YANG e colab., 2014). As linhagens de MHV possuem diferenças em seu organotropismo, virulência e patogenicidade, sendo classificadas como respiratórias ou enterotrópicas. As linhagens enterotrópicas MHV-D, MHV-DVIM, MHV-Y, e MHV-RI, têm sua replicação no intestino e sua transmissão ocorre primariamente pelas fezes. Enquanto isso, as linhagens respiratórias, como MHV-1, MHV-2, MHV-3, MHV-JHM, MHV-4, MHV-A59 e MHV-S, proliferam inicialmente no epitélio respiratório e olfatório e posteriormente têm sua disseminação para outros órgãos, sendo que sua transmissão ocorre pelo contato direto entre camundongos (KÖRNER e colab., 2020).

1.1.2 Estrutura dos coronavírus

O genoma dos coronavírus é constituído por RNA de fita simples senso positivo e possui cerca de 30 mil pares de bases, o que é representa um genoma relativamente grande quando comparados a outros vírus. Na porção 5' do RNA viral dos coronavírus estão localizadas duas grandes fases de leitura aberta (*open reading frames*; orf), a orf1a e orf1b, as quais ocupam cerca de dois terços do genoma viral e codificam duas grandes poliproteínas. Essas poliproteínas, por sua vez, são clivadas em 16 proteínas não estruturais (nsps), as quais possuem funções enzimáticas essenciais para o processamento do RNA e para a replicação viral (SNIJDER e colab., 2016).

A porção 3' do RNA viral dos coronavírus codifica as suas proteínas estruturais: a hemaglutinina esterase (HE), o nucleocapsídeo (N), a membrana (M), o envelope (E) e a proteína espícula (S). Esta última se distribui inserida em várias cópias pela

membrana da partícula viral, e, dessa forma, fornece a aparência de uma coroa solar ao vírus, o que dá o nome ao gênero.

1.1.3 Reprodução viral dos coronavírus

Vírus são parasitas obrigatórios e, portanto, necessitam da infecção de uma célula de um hospedeiro para consumação da reprodução viral e replicação do seu genoma. Nos coronavírus, o processo de infecção é iniciado com a interação da proteína S, constituída como um homotrímero, com os receptores virais do hospedeiro (COLLINS e colab., 1982). No caso das linhagens de MHV, a glicoproteína *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* (CEACAM)-1 é utilizada como receptor viral (WILLIAMS e colab., 1991), enquanto o SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) para a sua adsorção na célula do hospedeiro (HOFFMANN e colab., 2020). Com sua ligação ao receptor viral, a proteína S é clivada em S1 e S2 por proteases do hospedeiro. No caso do SARS-CoV-2, a sua proteína S é clivada pelas proteases celulares catepsina e a protease transmembrana tipo II (TMPRSS2) (MATSUYAMA e colab., 2010; SIMMONS e colab., 2005). A porção S1 é responsável pela ligação ao receptor viral, pois é nela que se encontra o domínio de ligação ao receptor (*receptor binding domain*; RBD) (BOSCH e colab., 2003), enquanto a porção S2 constitui a haste da proteína da S (ABRAHAM e colab., 1990; LUYTJES e colab., 1987). Nos coronavírus, a interação entre o RBD da S1 e o receptor viral é o fator determinante para que a infecção tenha êxito, além de ser responsável pelo organotropismo viral (CASAIS e colab., 2003).

Após a ligação do vírus ao seu receptor, inicia-se o processo de fusão e a conseguinte adsorção viral. A clivagem da proteína S promove uma alteração conformacional da região S2, a qual adota um formato helicoidal (DE GROOT e colab., 1987). Nesta nova conformação, os peptídeos de fusão contidos na S2 são expostos e interagem com a membrana do hospedeiro, culminado com a fusão de ambas as membranas, viral e celular (ECKERT e KIM, 2001).

Com a fusão de ambas as membranas, o genoma viral é liberado no citoplasma da célula do hospedeiro e é iniciada a tradução dos genes das poliproteínas, as quais darão origem as proteínas não estruturais. A partir de um processo de *frameshift*, a orf1a e a orf1b são traduzidas pela maquinaria ribossomal do hospedeiro, de modo que são sintetizadas duas poliproteínas: pp1a e pp1ab (BARANOV e colab., 2005). Em seguida, essas poliproteínas são clivadas nas proteínas não estruturais 1 a 16

(ZIEBUHR e colab., 2000), as quais participam do processamento e da replicação do RNA viral. Dentre as proteínas não estruturais estão presentes proteinases, responsáveis pelos eventos de clivagem das poliproteínas pp1a e pp1ab, enzimas de modificações pós-traducionais do RNA viral, as quais permitem que o RNA viral escape da imunidade do hospedeiro, e uma RNA polimerase, que participa do complexo de replicase viral, responsável pela síntese de RNA da progênie viral (YOSHIMOTO, 2021).

Após a replicação do RNA viral, as proteínas estruturais S, M e E são traduzidas e inseridas no retículo endoplasmático da célula do hospedeiro. Essas proteínas são transportadas em vesículas pela via secretória dos compartimentos intermediários entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (ERGIC) (KRIJNSE-LOCKER e colab., 1994; TOOZE e colab., 1984). É nessa região que ocorre a montagem e o brotamento da partícula viral madura. Inicialmente, o RNA viral interage com a proteína N através de uma sequência de sinalização (FOSMIRE e colab., 1992), o que resulta no empacotamento do RNA viral em uma forma helicoidal de associação à ribonucleoproteína (SURJIT e LAL, 2008). Esse complexo formado pela proteína N e pelo RNA viral é estabilizado pela proteína M e pela proteína E, o que promove a montagem da partícula viral (BOSCARINO e colab., 2008; BOSON e colab., 2021; NARAYANAN e colab., 2000). Após, ocorre o brotamento de vesículas a partir do ERGIC, as quais carregam partículas virais maduras até a membrana da célula do hospedeiro, onde ocorre sua exocitose (ORENSTEIN e colab., 2008).

1.2 Imunopatologia da COVID-19

O processo de infecção e de replicação viral é responsável por danos teciduais diretos ao hospedeiro, os quais iniciam um processo inflamatório. Essa resposta inflamatória é de extrema importância, visto que a ativação dos leucócitos residentes e o recrutamento de leucócitos circulantes para o sítio acometido é responsável pelo *clearance* viral. Esta dinâmica, entretanto, é complexa, visto que uma resposta inflamatória exacerbada, atrasada ou que ocorre em órgãos outros além do sítio infeccioso, pode gerar danos teciduais excessivos e, em alguns casos, levar hospedeiro à óbito, sendo, então, uma faca de dois gumes (TAVARES e TEIXEIRA e colab., 2016). Neste contexto, parte da patogênese da COVID-19, tanto pulmonar quanto sistêmica, é decorrente de um desequilíbrio do processo inflamatório em resposta à infecção pelo SARS-CoV-2 (MERAD e colab., 2022).

1.2.1 Alterações pulmonares da COVID-19

Durante uma infecção natural, o SARS-CoV-2 tem as células multiciliadas da nasofaringe e da traqueia e as células de sustentação do epitélio olfatório como os primeiros alvos de infecção (AHN e colab., 2021; KHAN e colab., 2021). Conforme a infecção progride, o SARS-CoV-2 pode alcançar as vias aéreas inferiores pela inalação de partículas virais provenientes do trato respiratório superior e pela disseminação gradual do vírus ao longo da árvore traqueobrônquica (HOU e colab., 2020). Ao atingir o tecido pulmonar, o SARS-CoV-2 infecta e induz a morte de células alveolares, particularmente os pneumócitos do tipo II (AHN e colab., 2021; SALAHUDEEN e colab., 2020). Apesar da dificuldade da obtenção de material de pacientes em estágio inicial da infecção por SARS-CoV-2 e, portanto, do entendimento do estágio de infecção alveolar, estudos *ex vivo* ajudam a esclarecer uma parcela dos mecanismos envolvidos. Neste sentido, estudos em organoides constituídos por pneumócitos do tipo II demonstraram que a infecção com SARS-CoV-2 promove a indução de vias de interferon (INF) do tipo I e do tipo III e a apoptose destas células, consequentemente diminuindo a secreção de surfactantes e dificultando a troca gasosa pulmonar (KATSURA e colab., 2020). Este processo inicial de infecção e morte de células alveolares induz uma resposta inflamatória pulmonar, a qual pode evoluir para a síndrome respiratória aguda grave (SRAG).

A SRAG é caracterizada por baixos níveis de oxigênio sanguíneo e opacidade em vidro fosco em ambos os pulmões em análises radiográficas (RANIERI e colab., 2012). Inicialmente, na fase exsudativa da SRAG, ocorre uma lesão alveolar difusa (DAD – do inglês *diffuse alveolar damage*) caracterizada pela morte de células endoteliais e de pneumócitos. A morte destas células resulta na quebra da barreira física formada pelo epitélio alveolar e, dessa forma, permite a exsudação de fluídos e de células imunes para o interior do espaço alveolar (KATZENSTEIN e colab., 1976). Esta formação de membranas hialinas e exsudatos ricos em fibrina no espaço intra-alveolar limita a troca de oxigênio realizada pelo pulmão. As alterações histopatológicas e inflamatórias da fase exsudativa são seguidas da fase proliferativa da SRAG, na qual os pneumócitos do tipo II adquirem um estado de hiperplasia na tentativa de regenerar os alvéolos. (CARDINAL-FERNANDEZ e colab., 2017; KATZENSTEIN e colab., 1976). Neste sentido, análises histológicas pulmonares provenientes de autópsias de pacientes com COVID-19 demonstraram um padrão de

lesão pulmonar semelhante ao observado na SRAG, com aspectos de ambas as fases, exsudativa e proliferativa, com edema intra-alveolar e intersticial, morte de pneumócitos, formação de membrana hialina e hiperplasia de pneumócitos do tipo II (GALLI e colab., 2020; MENTER e colab., 2020).

O dano epitelial e a inflamação associada à infecção pelo SARS-CoV-2 induz o recrutamento de leucócitos ao tecido pulmonar. Análises de *Single Cell Sequencing* do pulmão de pacientes que vieram a óbito pela COVID-19 evidenciaram a presença de um infiltrado inflamatório rico em macrófagos alveolares e derivados de monócitos. Além do aumento do acúmulo, os macrófagos alveolares apresentaram diminuição de AXL (MELMS e colab., 2021), um receptor importante para o processo de eferocitose e consequente *clearance* de células apoptóticas (SUBRAMANIAN e colab., 2014), o que pode indicar um prejuízo no processo resolutivo e na regeneração tecidual. O RNA do SARS-CoV-2, incluindo a fita senso negativo, foi identificado em macrófagos alveolares e em monócitos de pacientes com COVID-19, o que indica um processo de infecção produtiva nestas células (DELOREY e colab., 2021; GRANT e colab., 2021). É sugerido que os macrófagos alveolares inicialmente infectados atuem como “Cavalos de Tróia”, de modo a transferir partículas virais viáveis de SARS-CoV-2 para regiões pulmonares adjacentes, em vista de sua capacidade de locomoção e patrulha pelo espaço intra-alveolar (ARPAN SHARMA NEUPANE e colab., 2020). Dessa forma, estes macrófagos podem perpetuar a inflamação pulmonar por diversos mecanismos. Por exemplo, macrófagos infectados por SARS-CoV-2 aumentam a síntese e secreção de moléculas quimioatraentes para linfócitos, o que promove uma retroalimentação positiva entre os dois tipos celulares (GRANT e colab., 2021). Além disso, o microambiente pró-inflamatório pulmonar na COVID-19, particularmente a presença das citocinas TNF e IFN- γ , atua de forma sinérgica com a infecção pelo SARS-CoV-2 para induzir a PANoptose destes macrófagos infectados, um evento de morte celular no qual as vias de piroptose, apoptose e necroptose são ativadas concomitantemente (KARKI e colab., 2021). A morte celular decorrente da PANoptose resulta na liberação do conteúdo intracelular, incluindo citocinas inflamatórias e alarminas, o que pode exacerbar a resposta inflamatória já existente e contribuir para um quadro de tempestade de citocinas (SAMIR e colab., 2020).

Importante como primeira linha de defesa em infecções virais (GALANI e ANDREAKOS, 2015), os neutrófilos também participam do contexto da inflamação

pulmonar da COVID-19. Análises post-mortem de pacientes que sucumbiram por COVID-19 demonstraram a presença de neutrófilos associados à NETs em regiões alveolares, no interstício e nos compartimentos vasculares do tecido pulmonar (BARNES e colab., 2020; RADERMECKER e colab., 2020). Além disso, 31% dos pacientes com COVID-19 grave apresentaram neutrofilia no lavado broncoalveolar (GRANT e colab., 2021). Pacientes com COVID-19 grave que desenvolveram o quadro de SRAG apresentaram uma subpopulação de neutrófilos imaturos na circulação sanguínea, caracterizada pela presença de marcadores de distintos estágios da granulopoiese neutrofílica, o que indica um processo de mielopoiese desregulada nestes pacientes (SCHULTE-SCHREPPING e colab., 2020; WILK e colab., 2020). Em concordância, um estudo pré-clínico em modelo animal de camundongos demonstrou a presença de uma subpopulação aberrante de neutrófilos na medula óssea, na circulação sanguínea e no pulmão de animais infectados com MHV ou SARS-CoV-2. Essa subpopulação de neutrófilos apresentou um fenótipo imaturo, com altos níveis da alarmina S100A8/A, baixos níveis de Ly6G e baixa expressão *Cxcr2* e *Fcgr3*, genes altamente expressos em neutrófilos maduros. Analisando o aspecto funcional desta subpopulação, foi observado que esses neutrófilos possuem uma resposta imune inata alterada, com supressão de vias antivirais mediadas por INF do tipo I (GUO, Qirui e colab., 2021). Isso indica que os neutrófilos que participam da resposta inflamatória da COVID-19 adquirem um perfil de ativação de vias pró-inflamatórias e, ao mesmo tempo, supressão de vias antivirais, de modo a contribuir com a perpetuação do dano pulmonar observado na doença.

1.2.2 Alterações hematológicas e sistêmicas da COVID-19

A ativação e a morte de células epiteliais alveolares e o recrutamento de leucócitos com perfil pró-inflamatório pode promover a liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios e levar à um quadro conhecido como tempestades de citocinas (TISONCIK e colab., 2012). Neste sentido, pacientes com COVID-19 apresentaram maiores níveis séricos dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e IFN- γ quando comparados com pacientes saudáveis. Além disso, pacientes com COVID-19 que necessitaram de UTI tiveram maiores níveis plasmáticos de CCL2, CCL3 e TNF, quando comparados com pacientes que não precisaram de tratamento na UTI (HUANG e colab., 2020). Ademais, foi demonstrada uma correlação positiva entre altos níveis de IL-6 e maior gravidade da COVID-19 (LIU, Tao e colab., 2020).

Diversos mecanismos relacionados com uma resposta imune inadequada à infecção pelo SARS-CoV-2 podem explicar a indução do quadro de tempestade de citocinas da COVID-19. Primeiramente, a replicação viral e a consequente PANoptose de células residentes pulmonares pode causar a liberação de mediadores pró-inflamatórios (KARKI e colab., 2021). Outro fator sugerido é a alteração no perfil de células da imunidade inata frente à infecção pelo SARS-CoV-2, com supressão da resposta de INF do tipo I e secreção de quimiocinas recrutadoras de neutrófilos e de macrófagos (BLANCO-MELO e colab., 2020). Além disso, a resposta de INF do tipo I na COVID-19 é também prejudicada pela produção de autoanticorpos anti-INF do tipo I, os quais estão relacionados com aumento da gravidade e da mortalidade associada à doença (BASTARD e colab., 2021). Dessa forma, em um primeiro momento da infecção pelo SARS-CoV-2 as células imunes inatas respondem de forma inadequada e, com isso, falham na realização do *clearance* viral. A resposta antiviral atrasada é seguida de uma segunda fase, na qual uma resposta inflamatória exacerbada é desencadeada para conter a replicação viral (ZANZA e colab., 2022). O processo inflamatório proveniente da infecção pelo SARS-CoV-2, inicialmente pulmonar, atinge, então, proporções sistêmicas. Dentre os sistemas afetados, o sistema circulatório, com tecido sanguíneo e vasos, é afetado sofrendo diversas alterações.

A alteração hematológica mais frequente nos pacientes com COVID-19 é a linfopenia. Em um estudo clínico realizado na China, foi mostrado que 83,2% dos pacientes com COVID-19 admitidos no hospital apresentaram diminuição do número de linfócitos circulantes (GUAN e colab., 2020). Em uma meta-análise de pacientes com COVID-19 leve, moderada, grave ou fatal, o nível de linfócitos circulantes foi considerado um marcador de gravidade da doença, visto que pacientes com COVID-19 grave ou fatal apresentam quadro de linfopenia, enquanto o nível de linfócitos circulantes se manteve estável em pacientes com COVID-19 leve e moderada (HENRY e colab., 2020). Ademais, numa análise relacionada ao quadro de linfopenia, a razão entre o número de neutrófilos (NLR, do inglês *neutrophil to lymphocyte ratio*) circulantes pelo número de linfócitos circulantes, também demonstrou ser um marcador de progressão e de fatalidade da COVID-19, visto que o aumento desta razão foi correlacionado com casos graves e fatais da doença (LIAO, Danying e colab., 2020; PONTI e colab., 2020). Alguns mecanismos são sugeridos como responsáveis pela diminuição do número de linfócitos circulantes observada em pacientes com

COVID-19. Em análises post-mortem do baço e do linfonodo de pacientes que sucumbiram por COVID-19 foram observadas áreas de lesão tecidual e a apoptose de linfócitos. Além disso, foi detectado o acúmulo do genoma viral do SARS-CoV-2 nestes órgãos, o que pode sugerir um processo de apoptose mediado diretamente pela infecção viral (XIANG e colab., 2021). Em concordância um estudo *in vitro* demonstrou que a infecção de linfócitos por SARS-CoV-2 induz a sua apoptose (PONTELLI e colab., 2022). Também foi observado o aumento dos níveis de IL-6 e IL-1 β no baço e no linfonodo desses pacientes, citocinas as quais podem induzir a morte celular por piroptose (BERGSBAKEN e colab., 2009), de modo a contribuir para o quadro de linfopenia observado nos pacientes com COVID-19.

Outra manifestação hematológica apresentada pelos pacientes com COVID-19 é a hipercoagulabilidade. A formação de trombos pela ação do sistema imune, ou imunotrombose, é um processo no qual sistema imune e o sistema de coagulação cooperam para bloquear a disseminação de patógenos (ENGELMANN e MASSBERG, 2013). Entretanto, na COVID-19 uma porção dos pacientes desenvolvem um estado pró-trombótico exacerbado e, em consequência, ocorre um processo de hipercoagulabilidade. Neste sentido, de 3% a 11% dos pacientes com COVID-19 leve e de 17% a 47% dos pacientes com COVID-19 grave desenvolvem quadro de tromboembolismo (FANAROFF e LOPES, 2023).

Parte da fisiopatologia destes eventos trombóticos é decorrente da infecção direta do SARS-CoV-2 às células endoteliais, evento este que pode causar danos e promover a apoptose dessas células (VARGA e colab., 2020). Um estudo demonstrou que pacientes com COVID-19 possuem aumento nos níveis de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) em seu estado solúvel e aumento do número de células endoteliais na corrente sanguínea, sugerindo o dano e a morte destas células, respectivamente (FALCINELLI e colab., 2021). Ademais, elevados níveis circulantes de trombomodulina, um marcador de lesão endotelial, foi observado em pacientes com COVID-19, sendo associado à um maior risco de mortalidade nestes pacientes (GOSHUA e colab., 2020). Esta perturbação das células endoteliais expõe fatores teciduais que, em situações homeostáticas, se manteriam no interior da célula. Uma vez expostos, eles interagem com fatores de coagulação vasculares e ativam a cascata de coagulação extrínseca. Esta ativação leva à clivagem de fibrinogênio em fibrina e à formação de trombos (OWENS e MACKMAN, 2010). Além disso, o dano às

células endoteliais expõe a matriz extracelular subendotelial formada, em parte, por colágeno. O fator de von Willebrand, o qual está aumentado na circulação de pacientes com COVID-19 (PANIGADA e colab., 2020), se liga a matriz subendotelial exposta e atua como ponte de ligação às plaquetas, facilitando sua adesão, seu acúmulo e sua agregação, nos locais de lesão endotelial e, conseqüentemente, amplifica o processo de coagulação (SWIERINGA e colab., 2018). Neste sentido, a autópsias de pacientes que vieram à óbito pela COVID-19 demonstraram dano à vasculatura endotelial pulmonar, com presença de vírus intracelular nestas células, e uma alta prevalência de microtrombos pulmonares nestes pacientes quando comparados com pacientes que sucumbiram pela infecção por influenza (ACKERMANN e colab., 2020).

Outro fator relevante para a fisiopatologia dos eventos trombóticos da COVID-19 é a influência do ambiente inflamatório pulmonar em sua própria microvasculatura. Mediadores inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF e ferritina, aumentados na COVID-19 (HENRY e colab., 2020), atuam nas células endoteliais e promovem sua ativação, o que pode contribuir para o processo de coagulação observado nos pacientes (LEVI e VAN DER POLL, 2017). Neste sentido, um estudo pré-clínico em camundongos demonstrou que a infecção com SARS-CoV-2 ou MHV-3 induziu um prejuízo da contratilidade de células endoteliais, o que foi associado com a infecção do tecido vascular e com o aumento dos níveis de óxido nítrico no endotélio e de TNF no plasma (VIEIRA-ALVES e colab., 2023). Além disso, os níveis aumentados de quimiocinas no pulmão promovem a atração de leucócitos circulantes, particularmente monócitos e neutrófilos, os quais também participam do processo de imunotrombose. Os monócitos podem atuar através da exposição de fator tecidual presente em sua membrana celular e em vesículas secretadas (VON BRÜHL e colab., 2012). Já os neutrófilos podem promover a formação de trombos pelo processo de NETosis, no qual ocorre a concomitante morte celular e a liberação de *neutrophil extracellular traps* (NETs), redes de cromatina descondensada associadas a histonas e proteínas antimicrobianas, com função de aprisionar patógenos e expô-los a uma alta concentração de proteínas efetoras. Apesar desta função, as NETs também causam o aprisionamento de plaquetas e, além disso, induzem sua adesão, agregação e ativação (FUCHS e colab., 2010). As NETs também são enriquecidas com fator tecidual em sua composição (SKENDROS e colab., 2020). Dessa forma, a liberação

de NETs por neutrófilos circulantes pode participar dos eventos imunotrombóticos. Neste sentido, pacientes com COVID-19 apresentaram agregados de neutrófilos, plaquetas e NETs na microvasculatura do tecido pulmonar, cardíaco e renal, o que indica sua participação na formação de trombos (NICOLAI e colab., 2020).

As plaquetas, por sua vez, participam do processo de imunotrombose por diversos mecanismos. Dentre eles, as plaquetas são responsáveis pela liberação de padrões moleculares associados a danos, os quais promovem a síntese e a liberação de fator tecidual por células imunes presentes no trombo (REINHARDT e colab., 2008). Além disso, plaquetas ativadas interagem com neutrófilos e promovem a liberação de NETs (PAGE e PITCHFORD, 2013). Dessa forma, cria-se uma retroalimentação positiva de imunotrombose entre a ativação de leucócitos e de vias de coagulação na microvasculatura pulmonar (BONAVENTURA e colab., 2021).

1.3 Modelos pré-clínicos para o estudo da COVID-19

Após a emergência do SARS-CoV-2 em Wuhan, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para o estudo da patogênese da COVID-19. Dentre os modelos propostos, o estudo da infecção por SARS-CoV-2 foi e está sendo realizado em hamsters-sírio (SIA e colab., 2020), furões (SHI e colab., 2020) e primatas não-humanos (B e colab., 2020). O uso de camundongos como modelo experimental é extremamente disseminado em laboratórios de pesquisa. Entretanto, o SARS-CoV-2 não possui a capacidade de infectar camundongos selvagens, devido à interação ineficiente entre a proteína S viral e o receptor murino ortólogo ao receptor humano, a ECA (ZHOU e colab., 2020). Nesse sentido, foram estabelecidas estratégias para adaptação da infecção com SARS-CoV-2 em camundongos. Dentre elas, foi proposta a indução de ciclos de replicação viral seriada no pulmão de camundongos, para que ocorra a adaptação do domínio de ligação do receptor da proteína S à ECA2 murina (DINNON e colab., 2020). Outro modelo experimental desenvolvido é o de camundongos transgênicos para a proteína ECA2 humana direcionada ao gene promotor de citoqueratina 18, o qual é expresso exclusivamente por células epiteliais (WINKLER e colab., 2020). No entanto, nenhum dos modelos propostos abrange todo o entendimento sobre os processos de infecção, tropismo viral, replicação, disseminação, patogênese, sintomas e resposta imune ocasionadas pela infecção do SARS-CoV-2, sendo necessário o estudo diversos

modelos experimentais para a total compreensão da COVID-19 (EHAIDEB e colab., 2020).

1.3.1 MHV como modelo de estudo para COVID-19

Neste contexto, um modelo translacional proposto para o estudo da infecção e da patogênese do SARS-CoV-2 é a infecção de camundongos pelo MHV (KÖRNER e colab., 2020), um betacoronavirus que é patógeno natural de camundongos (*Mus musculus*), os quais são amplamente utilizados para estudos pré-clínicos. Múltiplas linhagens de MHV existem e, dentre elas, há variações em seus organotropismos, na virulência e na patogenicidade. Ambos MHV-3 e MHV-A59 fazem parte das linhagens que possuem tropismo primário para o sistema respiratório (BARTHOLD e SMITH, 1984; CARTHEW e SPARROW, 1981) e mimetizam uma parcela das alterações pulmonares observadas na COVID-19. Neste sentido, a infecção de camundongos C57BL/6 com o MHV-3 resultou em uma doença pulmonar transitória, caracterizada pela presença de infiltrado leucocitário rico em neutrófilos e macrófagos e aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-1 β , TNF, INF- γ e CCL2. Em consequência, os animais infectados com MHV-3 apresentaram as alterações histopatológicas de edema alveolar, hemorragia e trombos de fibrina, o que, por sua vez, acarretou em prejuízo da função pulmonar. Entretanto, pelo seu caráter hepatotrópico, a infecção com MHV-3 resultou em uma grave lesão hepática, viremia disseminada para diversos sítios, incluindo coração, rins e cérebro, e, consequente, morte dos animais (ANDRADE e colab., 2021). Este modelo, portanto, mimetiza um quadro de COVID-19 grave caracterizado por viremia e inflamação exacerbada e disseminada. Por outro lado, a infecção com o MHV-A59, uma linhagem com menor hepatotropismo, promoveu pneumonia aguda, com infiltrado pulmonar leucocitário e alterações histopatológicas contendo hemorragia e fibrose nas paredes alveolares. Além disso, houve aumento da expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF e INF- γ no pulmão dos animais infectados, enquanto genes de resposta de INF do tipo I tiveram sua expressão suprimida (YANG e colab., 2014). Estes achados são corroborados no presente estudo (**Figuras 25-29**), onde demonstramos que a inoculação do MHV-A59 resulta em uma doença de caráter pulmonar com desfecho clínico autolimitado, mimetizando um quadro de COVID-19 leve. Dessa forma, neste estudo utilizaremos ambas as abordagens experimentais mencionadas,

MHV-3 e MHV-A59, com a finalidade de mimetizar os quadros clínicos de COVID grave e COVID leve/moderada, respectivamente.

O principal fator limitante nos modelos murinos que utilizam o MHV para o estudo da infecção e da patogênese do SARS-CoV-2 é a distinção entre seus receptores virais, dado que o SARS-CoV-2 utiliza a ECA2 para sua adsorção, enquanto o MHV tem o CEACAM-1 como seu receptor viral. Entretanto, devido à sua capacidade de mimetizar aspectos da patogênese da COVID-19, o modelo murino de infecção com MHV representa uma interessante ferramenta de estudo para a doença (KÖRNER e colab., 2020), foco do presente trabalho. Além disso, uma vantagem do uso deste modelo murino é a necessidade de laboratórios de biossegurança de nível 2, tornando a pesquisa desenvolvida mais rápida e de menor custo.

1.4 Tratamentos anti-inflamatórios

A liberação de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento e ativação de leucócitos ao sítio inflamatório são eventos necessários para a eliminação do patógeno e o retorno à homeostase durante um processo infeccioso. Entretanto, uma resposta inflamatória inicialmente protetiva pode se tornar exacerbada e gerar danos teciduais permanentes ao hospedeiro (BRUDER e colab., 2006). Neste contexto, o uso de drogas anti-inflamatórias pode mitigar o dano tecidual e conter a resposta inflamatória. Duas vias anti-inflamatórias exploradas para o tratamento de doenças com condições inflamatórias são a via do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), pelo uso de inibidores seletivos de fosfodiesterase 4 (PDE4) (TEIXEIRA e colab., 1997), e a via dos glicocorticoides, pelo uso de análogos sintéticos.

1.4.1 Inibidores de PDE4

1.4.1.1 *Via do AMPc*

A resposta inflamatória é um processo orquestrado por diversas vias de sinalizações e, dentre elas, a via do AMPc possui um importante papel em cascatas de sinalização anti-inflamatórias e imunorregulatórias. O AMPc é um segundo mensageiro sintetizado a partir do ATP através de uma reação catalisada pela enzima adenilato ciclase (AC) (KAMENETSKY e colab., 2006). O acúmulo de AMPc intracelular está relacionado com a ativação de múltiplas cascatas de sinalização e, dentre elas, um importante alvo é a ativação da proteína quinase A (PKA). A ligação do AMPc às subunidades regulatórias da PKA promove a liberação de suas

subunidades catalíticas (SHABB, 2001), as quais fosforilam e ativam fatores de transcrição. Um exemplo é o CREB, fator de transcrição ativado pela fosforilação por PKA, que é responsável pelo aumento da transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias (SASSONE-CORSI, 1995; SCHAFER, 2012). Outro mecanismo de atuação do AMPc é pela ativação de Epac1/2 (do inglês *Exchange proteins directly activated by cAMP*), uma proteína efetora que se liga ao AMPc e, através de uma cascata de sinalização, reduz a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias e genes de proliferação celular (LI e colab., 2018). Além disso, o AMPc pode causar a inibição, direta ou dependente de CREB, do fator nuclear kappa B (NF-κB) (WITTMANN e HELLIWELL, 2013), um fator de transcrição importante para a indução da resposta inflamatória (LIU, Ting e colab., 2017).

Os níveis intracelulares de AMPc são regulados pela ação das fosfodiesterases (PDEs), as quais inativam o AMPc por sua catálise em AMP. Dentre as 11 isoformas de PDEs presentes em células de mamíferos (CONTI e BEAVO, 2007), a isoforma PDE4 é expressa majoritariamente em leucócitos, sendo encontrada em neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos B, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, basófilos e mastócitos (LI e colab., 2018; TEIXEIRA e colab., 1997). Assim, durante o processo inflamatório a concentração de AMPc intracelular dos leucócitos é regulada pela concomitante atividade das enzimas AC e PDE, as quais sintetizam e degradam o AMPc, respectivamente. Devido aos mecanismos anti-inflamatórios induzidos pelo aumento do AMPc em células imunes, inibidores seletivos da PDE4 foram desenvolvidos com a finalidade de tratar doenças inflamatórias.

1.4.1.2 Efeitos anti-inflamatórios da via do AMPc

A elevação do AMPc intracelular está relacionada com diversos eventos anti-inflamatórios, incluindo a inibição da secreção de mediadores inflamatórios, supressão da migração e da ativação de leucócitos, indução da síntese de moléculas anti-inflamatórias e indução da apoptose de polimorfonucleares.

In vitro, o aumento dos níveis intracelulares de AMPc em macrófagos estimulados com LPS reduziu a secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6 e IL-12, e das quimiocinas CCL3 e CCL4, pela ativação da PKA. Além disso, o AMPc induziu a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 por estes macrófagos (ARONOFF e colab., 2006; VAN DER POUW KRAAN e colab., 1995). Este efeito de redução da secreção de mediadores inflamatórios também foi observado pelo

tratamento com inibidores de PDE4 em modelos animais de isquemia e reperfusão, de lesão pulmonar aguda induzida por LPS e de infecção pulmonar com *Pneumococcal Pneumonia* (MIOTLA e colab., 1998; SOUZA e colab., 2001; TAVARES e GARCIA e colab., 2016). Corroborando com a redução de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, esses trabalhos demonstraram redução do acúmulo de neutrófilos no sítio inflamatório. Essa redução do acúmulo leucocitário com o tratamento com inibidores de PDE4 pode ser decorrente de dois eventos distintos: a inibição da migração e/ou a indução da apoptose. O aumento dos níveis de AMPc é responsável pela manutenção das barreiras que compartimentalizam os tecidos. Em um modelo de inflamação pulmonar desencadeada por LPS, o tratamento com roflumilaste, um inibidor seletivo de PDE4, promoveu a integridade da barreira epitelial e, conseqüentemente, reduziu a migração de neutrófilos ao sítio inflamatório, o que foi corroborado com um ensaio *in vitro* de transmigração (KONRAD e colab., 2015). Além disso, em um modelo de infarto agudo do miocárdio a depleção da isoforma PDE4B reduziu os níveis das integrinas ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais, o que diminuiu a interação endotélio-neutrófilo e suprimiu a migração destes leucócitos para o sítio inflamatório (WAN e colab., 2022). A inibição da PDE4 também reduzir o acúmulo de neutrófilos e eosinófilos pela indução de sua apoptose, um processo mediado pela inibição das vias PI3K/Akt e NF- κ B (SOUZA e colab., 2009, 2010). Além de seus efeitos na imunidade inata, o aumento dos níveis de AMPc também atuam em células da imunidade adaptativa direta ou indiretamente. Células apresentadoras de antígenos expostas a inibidores de PDE4 têm prejuízo na sua capacidade de indução da polarização de linfócitos para um perfil de resposta do tipo 1 (Th1) (HEYSTEK e colab., 2003). Em um modelo de fibrose cutânea a inibição da PDE4 com apremilast, um inibidor seletivo de PDE4, reduziu o acúmulo e suprimiu a diferenciação de linfócitos T para os fenótipos Th1, Th2, e Th17. Ainda, a utilização do apremilast para o tratamento de pacientes com psoríase e artrite psoriática promoveu redução da secreção de IFN- γ por linfócitos Th1 e IL-17 por linfócitos Th17 (SAKKAS e colab., 2017).

A inibição de PDE4 também está relacionada com a indução de eventos pró-resolutivos (TAVARES e colab., 2020). Por exemplo, o uso de rolipram, outro inibidor seletivo de PDE4, está relacionado com o aumento dos níveis de anexina A1 (AnxA1), um importante mediador pró-resolutivo, em modelos de pleurisia (LIMA e colab., 2017).

e pneumonia (TAVARES e GARCIA e colab., 2016). Ademais, a ativação da PKA resulta na fosforilação de um resíduo de serina da enzima 5-lipoxigenase e, conseqüentemente, promove a síntese de outro mediador pró-resolutivo, a 15-epi-lipoxina A4 (YE e colab., 2008). Outro evento pró-resolutivo, a fagocitose de corpos apoptóticos, ou eferocitose, também é promovido pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Neste sentido, macrófagos tratados com dibutilil AMPc (db-AMPc), um análogo de AMPc, e expostos a células apoptóticas apresentaram maior capacidade eferocítica, um processo dependente da ativação da PKA e associado com a ativação de Rac1, uma proteína necessária para o remodelamento do citoesqueleto e subsequente internalização do corpo apoptótico (FRASCH e colab., 2011; LEVERRIER e RIDLEY, 2001). Ademais, o tratamento com db-cAMP foi responsável pelo aumento da expressão de CD36, um receptor lipídico que medeia o processo de internalização de corpos apoptóticos (PARKS e colab., 2013). O processo de eferocitose, por sua vez, pode ser um indutor da reprogramação de macrófagos para um perfil pró-resolutivo (ARIEL e SERHAN, 2012), em conjunto com a ação de mediadores pró-resolutivos presentes no microambiente do sítio inflamatório (DP e colab., 2015). Nesse contexto, foi demonstrado que a ativação da AC pelo tratamento com forskolina ou pela administração de db-cAMP resultou no aumento da expressão de Arg-1, CD206, IL-10 e Ym-1, marcadores de macrófagos resolutivos (KE e colab., 2013; T e colab., 2018). Portanto, devido aos efeitos do aumento dos níveis intracelulares de AMPc na síntese de mediadores pró-resolutivos, na apoptose de granulócitos, na indução da eferocitose e na reprogramação de macrófagos, os agentes inibidores de PDE4 podem induzir um importante controle da resposta inflamatória.

Além de suas ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas, os inibidores seletivos de PDE4 possuem efeitos antitrombóticos. Em um estudo de meta-análise, o tratamento com roflumilaste em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma doença que representa um importante fator de risco para morbimortalidade proveniente de eventos cardiovasculares (SIN e MAN, 2005), foi associado à uma redução na incidência de eventos cardiovasculares adversos quando comparados aos pacientes tratados apenas com placebo (WHITE e colab., 2013). Dentre os mecanismos de ação sugeridos para os efeitos antitrombóticos da inibição de PDE4 estão a redução da interação de neutrófilos com plaquetas, diminuição da

liberação de NETs e menor secreção de fator tecidual por macrófagos (FURIE e FURIE, 1988; TOTANI e colab., 2016).

Devidos os efeitos anti-inflamatórios, pró-resolutivos e anti-trombóticos do aumento dos níveis de AMPc, os inibidores seletivos de PDE4 são utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias (CP e D, 2011; LI e colab., 2018; TEIXEIRA e colab., 1997). Dentre elas, o roflumilaste foi aprovado pela pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) em 2011 e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2017 para o tratamento da DPOC. A aprovação de seu uso foi resultado de quatro estudos clínicos, os quais demonstraram que o tratamento com roflumilaste melhorou a condição pulmonar e reduziu o número de exacerbações da DPOC nos pacientes tratados (CALVERLEY, Peter M.A. e colab., 2007; CALVERLEY, Peter MA e colab., 2009; RABE e colab., 2005; RENNARD e colab., 2011). Também foi demonstrado que o roflumilaste possui efeitos benéficos no tratamento de pacientes com asma. A administração de uma única dose de roflumilaste resultou na atenuação da hiperresponsividade e na redução do volume expiratório forçado após exposição ao alérgeno (LOUW e colab., 2007), duas importantes características da patogênese da asma (DS e HA, 1998). Além disso, tratamentos de maior duração, de 7 a 14 dias, demonstraram redução na resposta inflamatória tardia da asma alérgica, com diminuição do volume expiratório forçado, inibição da presença de eosinófilos e neutrófilos no escarro e redução da hiperresponsividade nos pacientes tratados (GAUVREAU e colab., 2011; VAN SCHALKWYK e colab., 2005). Outro inibidor seletivo de PDE4, o apremilast, foi aprovado pelo FDA para o tratamento de casos moderados a severos de psoríase e artrite psoriásica, doenças caracterizadas por inflamação crônica na pele e nas articulações, respectivamente (BOEHNCKE e SCHÖN, 2015). Em ensaios clínicos multicêntricos, randomizados, duplo-cegos e com placebo, o uso de apremilast reduziu a gravidade e a extensão da psoríase em placa, incluindo manifestações nas unhas, cabelo e regiões palmoplantares, e melhorou os sintomas e a função física de pacientes com psoríase artrítica, quando comparados ao grupo placebo (A e colab., 2014, 2015; C e colab., 2015). Ainda, o crisaborole, outro inibidor seletivo de PDE4, foi aprovado pelo FDA em 2016 para o tratamento de dermatite atópica leve a moderada. Dois ensaios clínicos demonstraram melhora dos parâmetros de eritema, endurecimento da pele, formação de pápulas e de feridas nos pacientes com dermatite atópica tratados com crisaborole (PALLER e colab., 2016).

1.4.1.3 Inibidores de PDE4 na COVID-19

Devido à maior potência do roflumilaste e de seu metabólito, roflumilaste N-óxido, na indução de efeitos anti-inflamatórios quando comparados a outros inibidores seletivos de PDE4 (HATZELMANN, A., & SCHUDT, 2001), à sua tolerabilidade, à sua aprovação para o uso terapêutico para uma doença pulmonar, a DPOC, aos efeitos adversos esperados por um inibidor seletivo de PDE4 e aos seus efeitos regulatórios da inflamação e de eventos trombóticos, ambos importantes aspectos da patogênese da COVID-19, o tratamento com roflumilaste se torna um interessante alvo terapêutico para o tratamento da COVID-19. Neste sentido, alguns artigos de revisão sugerem a avaliação dos efeitos terapêuticos da inibição da PDE4 em pacientes com COVID-19 (DALAMAGA e colab., 2020; LUGNIER e colab., 2021; S e V, 2021). Um estudo clínico recente investigou os efeitos da combinação de apremilast com a dexametasona, um análogo de glicocorticoide, e o remdesivir, um antiviral, para o tratamento de pacientes com COVID-19 grave. Os pacientes tratados concomitantemente com as três drogas, apremilast, dexametasona e remdesivir, não apresentaram diferenças no tempo de recuperação e na mortalidade quando comparados aos pacientes tratados somente com dexametasona e remdesivir (FILES e colab., 2023). Este resultado deve ser interpretado com cautela, visto que os efeitos de inibidores de PDE4 per si ainda não foram avaliados em pacientes com COVID-19. Neste caso, os efeitos do apremilast nos parâmetros de tempo de recuperação e na mortalidade podem ter sido mascarados pela sua associação com o tratamento com dexametasona e remdesivir, já adotado na clínica como tratamento padrão para pacientes com COVID-19. Além disso, o estudo não avaliou a eficácia de diferentes posologias e intervalos de tratamento com o apremilast, de modo que a estratégia terapêutica adotada no estudo pode não ser a mais adequada para pacientes com COVID-19.

1.4.2 Glicocorticoides

1.4.2.1 Via dos glicocorticoides

Os glicocorticoides são hormônios esteroides secretados pela zona fasciculada do córtex da adrenal e participam da manutenção da homeostase sistêmica pela resposta à estressores internos e externos ao organismo. Dessa forma, os glicocorticoides regulam funções fisiológicas de todos os órgãos, tecidos e células, incluindo as células do sistema imune (CHROUSOS, 2009). Os leucócitos são

particularmente sensíveis aos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos glicocorticoides, de modo que moléculas desta natureza são adotadas como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias (BOUMPAS e colab., 1993). A sinalização dos glicocorticoides é mediada por um receptor intracelular, o receptor de glicocorticoide (GR, do inglês *Glucocorticoid receptor*). O GR atua como um fator de transcrição dependente de hormônio, de modo que a ligação do glicocorticoide induz alterações conformacionais em sua estrutura e promove seu transporte do citoplasma ao núcleo celular (KINO e CHROUSOS, 2004). Uma vez no núcleo, o GR atua como fator de transcrição e regula, positiva e negativamente, a expressão de uma grande diversidade de genes, estimado em 5 a 20% de todo genoma humano expresso (GALON e colab., 2002; KINO e colab., 2007). Apesar de sua ampla atuação, a qual abrange todos os sistemas, os efeitos dos GR como fator de transcrição são célula e tecido dependentes. Isso ocorre, principalmente, devido à uma regulação ao nível epigenético, na qual modulações de histonas e de cromatina, como metilações, acetilações e fosforilações, alteram a sua acessibilidade ao DNA e, conseqüentemente, seus efeitos (WEIKUM e colab., 2017).

Na ocorrência do estímulo estressor de inflamação tecidual, mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6 e TNF, atingem a circulação e atuam nas regiões do hipotálamo e da glândula pituitária, de modo a estimular a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), respectivamente (ANNANE, 2016; CHROUSOS, 1995). O ACTH, por sua vez, atua na zona fasciculada do córtex adrenal, de modo a estimular a síntese e secreção de cortisol, o qual é liberado na corrente sanguínea e atinge proporções sistêmicas, concluindo o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (CHROUSOS, 1995). Em uma situação de resposta inflamatória exacerbada, a secreção de cortisol atua de modo a suprimir o sistema imune e, dessa forma, reduzir o dano tecidual (SILVERMAN e STERNBERG, 2012). Entretanto, os efeitos da indução do eixo HPA e da liberação de cortisol são transitórios, visto que o próprio cortisol sinaliza negativamente aos seus centros regulatórios e, dessa forma, suprime sua secreção (CHROUSOS, 1995). Neste sentido, análogos sintéticos foram produzidos pela indústria farmacêutica para atuarem como os glicocorticoides endógenos e promover efeitos anti-inflamatórios. Um exemplo é a dexametasona, um análogo de cortisol com potência anti-inflamatória cerca de 30 vezes maior do que o cortisol endógeno e com baixa atividade de

mineralocorticoide, o que a torna uma molécula interessante para o tratamento de doenças inflamatórias na clínica médica (SWARTZ e DLUHY, 2012).

1.4.2.2 Efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides

Os principais efeitos dos glicocorticoides no sistema imune são de inibição da produção de moléculas pró-inflamatórias, supressão da migração de leucócitos ao sítio inflamatório, indução de apoptose de leucócitos, reprogramação de macrófagos para um perfil pró-resolutivo e a supressão da ativação de linfócitos (CAIN e CIDLOWSKI, 2017). Mecanicamente, o GR ligado à molécula de glicocorticoide é transportado ao núcleo se associa e inibe a atuação de fatores de transcrição importantes para a indução do processo inflamatório, como o NF- κ B, o AP-1 e o fator regulador 3 de interferon (IRF-3). Além disso, os glicocorticoides também promovem a síntese de moléculas anti-inflamatórias como *glucocorticoid-induced leucine zipper protein* (GILZ), a qual tem como um de seus efeitos a inibição de NF- κ B (BEAULIEU e MORAND, 2011). Portanto, através da inibição de fatores de transcrição que atuam como alicerce para o processo inflamatório, os glicocorticoides suprimem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF, e quimiocinas, como CCL2, CCL3 e CCL5 (CAIN e CIDLOWSKI, 2017). Além desta diminuição da secreção de quimiocinas, os glicocorticoides reduzem o recrutamento de leucócitos ao sítio inflamatório pela supressão de moléculas envolvidas com a interação leucócito-endotélio, como a diminuição de E-selectina e da integrina ICAM-1 em células endoteliais e da integrina antígeno-1 associado a função linfocitária em leucócitos (ATSUTA e colab., 1999; CRONSTEIN e colab., 1992; WÜST e colab., 2008). Os glicocorticoides também atuam pela indução da apoptose de eosinófilos, linfócitos e macrófagos (ADACHI e colab., 1996; TUOSTO e colab., 1994; ZENG e colab., 2017), podendo este ser um dos principais mecanismos de imunossupressão causado pelo seu uso. Outro evento promovido pela ação dos glicocorticoides é a reprogramação de macrófagos para um perfil pró-resolutivo, caracterizado por elevada expressão de CD163, CD206 e MER tirosina quinase (MERTK), receptores do tipo *scavenger* envolvidos no processo de captura e engolfamento de células apoptóticas (EHRCHEN e colab., 2007). Consequentemente, a exposição de macrófagos à glicocorticoides resulta no aumento da eferocitose de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos apoptóticos (GILES e colab., 2001; MCCOLL e colab., 2009). Ademais, macrófagos expostos a glicocorticoides apresentaram maior expressão do receptor de lipoxina A4, um

mediador lipídico pró-resolutivo (SERHAN e colab., 2008). Os glicocorticoides também possuem efeitos de supressão da ativação de linfócitos por mecanismos de diminuição da sinalização de TCR e consequente redução da secreção de citocinas (TSITOURA e ROTHMAN, 2004). No entanto, essa supressão da atividade de células T aparenta ser particular aos linfócitos Th1 e Th17, relacionados à indução de uma resposta pró-inflamatória, enquanto, de forma contrária, os linfócitos Th2 e Treg são ativados pela ação dos glicocorticoides (ELENKOV, 2004; KARAGIANNIDIS e colab., 2004).

1.4.2.3 Glicocorticoides na COVID-19

Devido aos seus efeitos anti-inflamatórios bem documentados, o uso de glicocorticoides foi sugerido como uma potencial estratégia terapêutica para a COVID-19 desde o início da emergência do SARS-CoV-2 (PRESCOTT e RICE, 2020). Neste sentido, um grande estudo clínico de 2020 denominado RECOVERY avaliou os efeitos da dexametasona em pacientes com COVID-19 leve e grave. A administração de dexametasona para o tratamento de pacientes com COVID-19 grave em regime de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação reduziu a incidência de mortalidade nestes pacientes em 33% e 20%, respectivamente. Enquanto isso, pacientes com COVID-19 leve não apresentaram efeitos benéficos com o uso de dexametasona (P e colab., 2021). Estes achados foram corroborados posteriormente por uma meta-análise que avaliou este e outros 6 ensaios clínicos randomizados (STERNE e colab., 2020). Além disso, mais recentemente foi demonstrado que a redução da incidência de mortalidade da COVID-19 grave com o tratamento com dexametasona foi acompanhada pela diminuição de complicações neurológicas, como derrame, convulsão, meningite ou encefalite, nos pacientes tratados (GRUNDMANN e colab., 2023).

A diminuição do quadro de mortalidade observada em pacientes com COVID-19 grave tratados com dexametasona pode estar relacionada com seus efeitos anti-inflamatórios. Pacientes com COVID-19 grave tratados com dexametasona tiveram redução total do número de neutrófilos circulantes. Além da redução na quantidade, o tratamento com dexametasona alterou o perfil dos neutrófilos no sangue periférico. Houve redução de uma população de neutrófilos com vias de INF ativas (INF^{ativa}), a qual é mais predominante encontrada no lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 grave quando comparado com pacientes com COVID-19 moderada (LIAO,

Mingfeng e colab., 2020; ZHAO e colab., 2021). Enquanto isso, uma subpopulação de neutrófilos imunossupressores foi aumentada na circulação dos pacientes tratados com dexametasona, a qual foi caracterizada por alta expressão de *ARG1* e *ANXA1*, moléculas relacionadas com eventos imunorregulatórios e pró-resolutivos (ARLAUCKAS e colab., 2018; VAGO e colab., 2012) e que têm seus genes diretamente regulados pela ação dos glicocorticoides (KELLY-SCUMPIA e colab., 2020; OKUN e colab., 2015). Portanto, a diminuição da subpopulação de neutrófilos *INF^{ativa}* e o aumento da subpopulação de neutrófilos imunossupressores em estágios tardios da COVID-19 pode estar relacionado com um menor dano tecidual nos pacientes tratados com dexametasona e, conseqüentemente, com a menor incidência de mortalidade observada nestes pacientes (SINHA e colab., 2021). Um outro estudo avaliou o perfil linfocitário na circulação de pacientes com COVID-19 grave tratados ou não com dexametasona e demonstrou que pacientes tratados possuem redução do número de linfócitos T *CD8⁺* citotóxicos e de linfócitos *Th1*. Além disso, essas células tiveram diminuição da ativação *NF-κB* e da expressão de *IL6* e de *INF*, o que pode estar relacionado com uma supressão da tempestade de citocinas observada nos pacientes tratados com dexametasona. Além disso, o tratamento com dexametasona causou a supressão de vias de exaustão imune, como *CTLA4*, *PDCD1*, *CD86*, *FASLG*, nos linfócitos *TCD8⁺* dos pacientes tratados (CHIMOTE e colab., 2023). Essa supressão pode representar um dos mecanismo de melhora da mortalidade observada com o tratamento com dexametasona, visto que pacientes com COVID-19 grave têm uma maior ativação de vias de exaustão imune quando comparados a pacientes com a COVID-19 leve (KUSNADI e colab., 2021), e que a exaustão imune está relacionada com a com perda de função celular, hipoatividade e, conseqüentemente, menor capacidade de *clearance* viral por estes linfócitos (BLANK e colab., 2019).

A diminuição da incidência de mortalidade observada em pacientes tratados com dexametasona pode também estar relacionada com seus efeitos no sistema circulatório. Foi demonstrado que o glicocálice de células endoteliais, que possui ação anti-trombótica e é um importante regulador da permeabilidade vascular e da adesão celular, sofre danos em pacientes com COVID-19 (ASTAPENKO e colab., 2022; ZHA e colab., 2022). Os pacientes tratados com dexametasona tiveram redução dos níveis plasmáticos de E-selectina e de sindecan-1 quando comparados com pacientes não

tratados, indicando menor dano endotelial e maior integridade do glicocálice. Ainda, o tratamento com dexametasona reduziu os níveis plasmáticos de IL-17A (ASIF e colab., 2023), uma citocina relacionada com a indução de eventos trombóticos (RAUCCI e colab., 2020). Dessa forma, o tratamento com dexametasona pode ter diminuído a mortalidade dos pacientes com COVID-19 através da redução de um estado pró-trombótico.

1.5 Terapias para o tratamento da COVID-19

Atualmente a OMS recomenda o uso de três antivirais, o remdesivir, o molnupiravir e o nirmatrelvirand/ritonavir, e três imunoterapias, a dexametasona, os antagonistas do receptor da IL-6 e o Baricitinib, como possíveis terapias para a COVID-19. Devido aos seus diferentes mecanismos de ação, a recomendação de uso para cada um destes fármaco pode variar conforme a gravidade da doença do paciente (LAMONTAGNE e colab., 2022). Dentre as imunoterapias, a dexametasona se destaca como o tratamento padrão para a COVID-19. O seu uso foi associado à diminuição da incidência da mortalidade em pacientes com COVID-19 grave em regime de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação (P e colab., 2021). O uso de antagonistas do receptor da IL-6, tocilizumab e sarilumab, diminuiu o risco de mortalidade em pacientes com COVID-19 grave quando comparados a pacientes tratados com placebo (ABANI e colab., 2021; REMAP-CAP INVESTIGATORS, 2021). Além disso, o tratamento com baricitinib, um inibidor da *janus tyrosine kinase* (JNK), reduziu o tempo de recuperação de pacientes hospitalizados com COVID-19, sendo que este efeito foi mais proeminente nos pacientes em regime de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação (KALIL e colab., 2021). Além disso, o tratamento de pacientes com COVID-19 com a combinação de baricitinib e dexametasona causou uma maior redução da incidência de mortalidade quando comparado ao tratamento com apenas dexametasona (MARCONI e colab., 2021). Devido à eficácia restrita aos pacientes que estão em necessidade regime de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação, as imunoterapias são recomendadas para pacientes com COVID-19 moderada, grave ou crítica e que apresentam progressão da doença, podendo ser combinadas para o aumento da eficácia (VAN DE VEERDONK e colab., 2022).

Apesar de possuírem eficácia em uma parcela da população, as imunoterapias adotadas para o tratamento da COVID-19 não abrangem a totalidade dos pacientes. Devido à complexidade da resposta ao SARS-CoV-2, tratamentos que promovem a

melhora do quadro clínico em alguns pacientes podem, em outros, não ter efeitos ou, ainda, causar uma piora do paciente. Outra questão a ser avaliada é a disponibilidade das imunoterapias incorporadas como tratamento padrão da COVID-19 atualmente. Terapias baseadas em anticorpos, como o baricitinib, o tocilizumab e o sarilumab, são dispendiosas e em muitos países tornam-se inviáveis para toda a população pelo seu alto custo. As imunoterapias também possuem efeitos adversos e, dentre elas, o uso de glicocorticoides pode promover maior risco de infecções oportunistas e o desenvolvimento de hiperglicemia, ambos relatados em pacientes com COVID-19 (ABDOLI e colab., 2022; BROOKS e colab., 2022). Portanto, o estudo de potenciais novas imunoterapias é importante para ampliar o espectro de tratamento da COVID-19, para o desenvolvimento de terapias economicamente viáveis para a população e para o refinamento dos protocolos de tratamentos adotados, com a finalidade de evitar efeitos adversos aos pacientes.

Diante do exposto acima, temos como proposta deste estudo avaliar os efeitos do roflumilaste, um inibidor de PDE4 já aprovado para o uso humano no tratamento de COPD, e da combinação de roflumilaste com dexametasona, no tratamento da inflamação pulmonar em modelo de infecção intranasal com betacoronavirus murino MHV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de tratamentos anti-inflamatórios em modelos murinos de COVID-19 pela infecção intranasal com MHV.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com roflumilaste no modelo murino de COVID-19 grave pela infecção intranasal com MHV-3.

Avaliar os efeitos do tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona no modelo murino de COVID-19 grave pela infecção intranasal com MHV-3.

Caracterizar o modelo murino de COVID-19 leve/moderada pela infecção intranasal com MHV-A59.

Avaliar os efeitos do tratamento com roflumilaste no modelo murino de COVID-19 leve/moderada pela infecção intranasal com MHV-A59.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de ética

Os camundongos da linhagem C57BL/6 de 4 a 8 semanas foram obtidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG). Os animais ficaram alojados em um biotério de 40 m². As gaiolas no biotério têm dimensões de 28x13x16 cm e foram separadas horizontalmente por 5 cm de cada uma e 60 cm verticalmente, com, no máximo, 6 animais em cada gaiola. Houve o controle de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (50%) ventilação e ciclo da luz (12h-claro/12h-escuro). Os animais tiveram acesso à água e ração sem restrição. Protocolo CEUA: 157/2021.

3.2 Células

As células L929 (ATCC CCL-1) foram cultivadas em atmosfera controlada (37°C e 5% CO_2) em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) rico em glicose suplementado com 7% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, e 100 mg/ml de estreptomicina.

3.3 Vírus

A linhagem viral de MHV-3 foi fornecida e sequenciada (acesso do GenBank de código MW620427.1) por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil), e propagada em células L929. A linhagem viral de MHV-A59 (VR-764™) foi adquirida da ATCC (Manassas, Virgínia, EUA), e propagada em células L929.

3.4 Titulação viral

Para titulação viral, 100 mL de suspensão viral diluída em série, amostras de plasma e homogeneizados teciduais (1:9 de tecido para DMEM 2%), foram inoculadas em monocamada confluyente de células L929 cultivadas em placas de 24 poços. Após 1 hora de agitação leve, as amostras foram removidas e substituídas com meio DMEM contendo CMC 0,8%, 2% soro bovino fetal e 1% de penicilina estreptomicina-glutamina, o qual foi mantido por 3 dias à 37°C e 5% CO_2 . Após, as células foram fixadas com formalina 10% neutralizada com tampão por 1 hora e coradas com cristal violeta 0.1%. Os títulos virais foram determinados em unidades formadoras de placas (PFU).

3.5 Reagentes e drogas

O roflumilaste DAXAS® foi adquirido da Astrazeneca Brasil (Cotia, SP, Brasil). O Decadron injetável (fosfato dissódico de dexametasona) foi adquirido da Ache (Guarulhos, SP, Brasil). Os kits de ELISA para IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , CXCL1, CXCL2, CCL2 e TGF- β foram adquiridos da R&D system (Minneapolis, MN, EUA). O kit de quantificação de proteínas Sensiprot (Ref.: 36) foi adquirido da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil). O anticorpo monoclonal anti-Ly6G coelho (ab238132), a solução de bloqueio para imuno-histoquímica Protein Block (ab64226) e o DAB Substrate Kit (ab64238) foram adquiridos da Abcam (Boston, Massachusetts, EUA).

3.6 Infecção *in vivo* por MHV-3 e MHV-A59

Os camundongos foram anestesiados com dose não letal de 50 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal. Após a anestesia, os camundongos receberam a inoculação intranasal de 30 μ L de salina estéril contendo ou não (controles não infectados) 3×10^2 , 3×10^3 ou 3×10^4 PFU de MHV-3 ou de MHV-A59, conforme descrito no corpo dos resultados e nas legendas das figuras.

3.7 Tratamento com roflumilaste

O tratamento com roflumilaste DAXAS® foi administrado via oral aos camundongos. Comprimidos contendo 500 microgramas de roflumilaste foram macerados e diluídos em CMC 0,5%. As distintas doses e estratégias de tratamentos adotadas foram descritas de acordo no corpo dos resultados e nas legendas das figuras.

3.8 Tratamento com dexametasona

O tratamento com dexametasona foi administrado via intraperitoneal aos camundongos. A solução injetável de 4 mg/mL de fosfato dissódico de dexametasona foi diluída em salina estéril para o volume final de 200 μ L. As distintas doses de tratamento adotadas foram descritas de acordo no corpo dos resultados e nas legendas das figuras.

3.9 Escore clínico

Os animais não infectados e os animais infectados com MHV-3 e MHV-A59 foram acompanhados para avaliação de sinais clínicos da doença: eriçamento do pelo (0-2), arqueamento do dorso (0-2), caquexia (0-3), baixa atividade (0-2), secreção

ocular (0-3) e dificuldade para respirar (0-2), totalizando 15 pontos de escore. Animais que chegaram à 80% do peso inicial ou que morreram durante o experimento foram considerados com escore máximo. A confecção desse escore foi baseada no livro “The laboratory mouse” e no capítulo de livro “Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice” (CHARMAINE e MOLLIE, 1999; SUCKOW e colab., 2023).

3.10 Coleta das amostras

Seguido da injeção letal de anestésico por via intraperitoneal com 240mg/kg de ketamina e 30mg/kg de xilazina, uma amostra de sangue foi coletada dos camundongos pela veia cava inferior e armazenada em tubo contendo EDTA. Para os experimentos de infecção com MHV-A59, o lavado broncoalveolar dos camundongos foi coletado pela canulação da traqueia com um cateter de polipropileno de 1.7 mm e pela confecção de duas lavagens das vias aéreas com 0,8 mL de PBS 1X cada. O pulmão dos animais foi coletado e separado em lobo direito, para ensaios de ELISA e titulação, e em lobo esquerdo para análise histológica. Segmentos do lobo esquerdo do fígado dos animais foram coletadas para ensaios de titulação e para análise histológica. Tecidos coletados para ensaios de ELISA e titulação foram imediatamente armazenados à -80°C e tecidos coletados para histologia foram fixados em formalina 10% tamponada.

3.11 Análise hematológica

O número de plaquetas e leucócitos circulantes nas amostras de sangue foram determinados pela utilização do hemocitômetro Celltac MEK-6500K hemocytometer (Nihon Kohden).

3.12 Análise histológica de escore inflamatório

Tecidos pulmonares e hepáticos foram, em sequência, fixados em formalina, embebidos em parafina, cortados em 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados sob microscopia de luz. O escore inflamatório pulmonar foi determinado por um patologista, o qual avaliou, em avaliação cega, os parâmetros de: inflamação das vias aéreas (0-4), inflamação vascular (0-4), inflamação do parênquima (0-5) e infiltrado polimorfonuclear (0-5). A avaliação inflamatória pulmonar foi enquadrada em uma tabela de contingência de gravidade do escore inflamatório: ausente (0-1), leve (2-5), moderada (6-9), intenso (10-14), grave (15-18). Para análise histopatológica do fígado, os seguintes parâmetros foram avaliados: infiltrado inflamatório (0-5), dilatação vascular (0-5), degeneração (0-5), necrose (0-5) e

hemorragia (0-5). A avaliação histopatológica hepática foi enquadrada em uma tabela de contingência de gravidade do escore inflamatório: ausente (0-1), leve (2-6), moderada (7-12), intenso (13-18), grave (19-25).

3.13 Quantificação de citocinas e quimiocinas

A concentração das quimiocinas e citocinas foram medidas do homogeneizado pulmonar. Amostras de pulmão foram homogeneizadas em PBS contendo anti-proteinases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM cloreto de benzetônio, 20 unidades do inibidor calicreína, aprotinina A), 10 mM de EDTA e 0,05% Tween 20. Após centrifugação à 10.000 rpm por 10 minutos e à 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinar a concentração de IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL5 e TGF- β por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e as reações colorimétricas foram analisadas por um espectrofotômetro à 492 nm.

3.14 Imuno-histoquímica

O tecido pulmonar foi fixado em formalina, embebido em parafina, cortado em 5 μ m de espessura e sujeito à imunodeteção para Ly6G como um marcador específico de neutrófilo (LEE, Pui Y e colab., 2013). Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados pela subsequente passagem em etanol 100% até etanol 50%. A recuperação antigênica foi realizada em tampão EDTA (pH 9) por 20 minutos à 96 °C no banho maria. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio 3% em duas incubações de 15 minutos e o bloqueio inespecífico foi realizado pelo Protein Block Abcam em uma incubação de 5 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo monoclonal anti-Ly6G coelho (1:2000) *overnight* na câmara escura úmida à 4°C. Cortes controle negativo foram incubados com BSA 0,1%. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo anti-coelho biotilado do Kit ABC e posteriormente incubados com streptavidina-peroxidase do Kit ABC, ambas incubações em câmara escura úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. A imunorreação foi visualizada com a incubação com 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) pelo DAB Substrate Kit Abcam seguida da contracoloração com hematoxilina e eosina. Para a contagem de células Ly6G⁺, cinco campos de cada região, alveolar, peribronquiolar e perivascular, do tecido pulmonar foram escolhidos aleatoriamente e fotografados na magnificação de 400X.

3.15 Quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar

As proteínas totais do lavado broncoalveolar foram avaliadas pelo teste colorimétrico Sensiprot da Labtest Diagnóstica S.A de acordo com as instruções do fabricante.

3.16 Análises estatísticas

O software GraphPad Prism (v.9.3.0) foi utilizado para as análises estatísticas. *Outliers* significativos, determinados pelo teste de Grubbs ($P < 0.05$), foram excluídos dos dados previamente às seguintes análises. Os dados foram testados para a normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk. Dados que passaram pelo teste de normalidade foram analisados pelo Teste t de Student para comparação entre apenas dois grupos e one- ou two-way analysis of variance (ANOVA) com o pós teste de Dunnett para comparação entre mais de dois grupos. Dados que não tinham a distribuição normal foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal–Wallis. Os dados foram mostrados como média dos valores $\pm$ erro padrão da média, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 A infecção de camundongos com MHV-3 induz sinais clínicos, perda de peso e tempo médio de sobrevivência inóculo dependente

Inicialmente, analisamos os sinais clínicos, a perda de peso e a sobrevivência de animais infectados com MHV-3 nos inóculos de 3×10^2 , 3×10^3 e 3×10^4 PFU, com intuito de validar o lote de vírus específico que foi utilizado para a condução desse projeto (**Figura 1**).

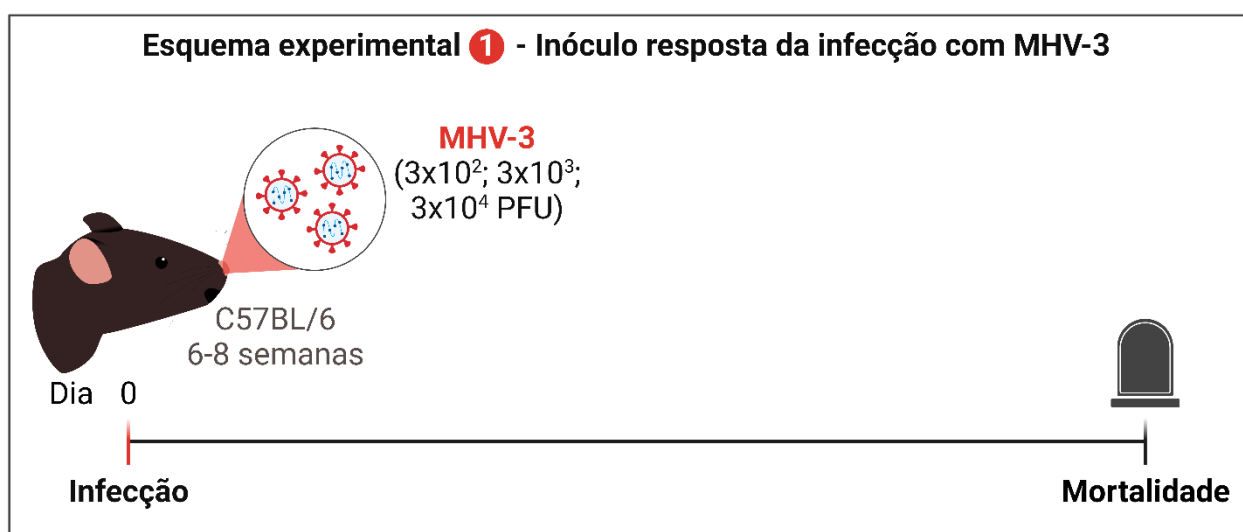


Figura 1. Esquema experimental 1: inóculo resposta da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas foram infectados por via intranasal com 3×10^2 , 3×10^3 ou 3×10^4 PFU de MHV-3 e acompanhados diariamente para análises de perda de peso, aspecto clínico e sobrevivência.

A infecção por MHV-3 induziu sinais clínicos com cinética distintas de acordo com o inóculo administrado aos camundongos. Os animais infectados com 3×10^3 PFU de MHV-3, o inóculo intermediário, apresentaram perda de peso significativa a partir do 3º dia após a infecção (**Figura 2A**) e aumento acentuado do escore clínico no 5º dia após a infecção (**Figura 2B**), quando comparados com os animais não infectados. Os animais infectados com este inóculo tiveram média de sobrevivência no 6º dia após a infecção pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier (**Figura 2C**). Os inóculos de 3×10^2 PFU e de 3×10^4 PFU também foram letais aos animais infectados. Entretanto, as cinéticas de perda de peso, de escore clínico e de sobrevivência foram retardadas no inóculo de 3×10^2 PFU e adiantadas no inóculo de 3×10^4 PFU (**Figura 2A-C**). Estes dados corroboram com o trabalho de padronização do modelo de infecção com MHV-3 previamente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (ANDRADE e colab., 2021). Neste trabalho, os dados sobre a inflamação pulmonar induzida pela infecção com

MHV-3 foram obtidos com o inóculo intermediário de 3×10^3 PFU. Portanto, este mesmo inóculo foi escolhido para os experimentos deste trabalho.

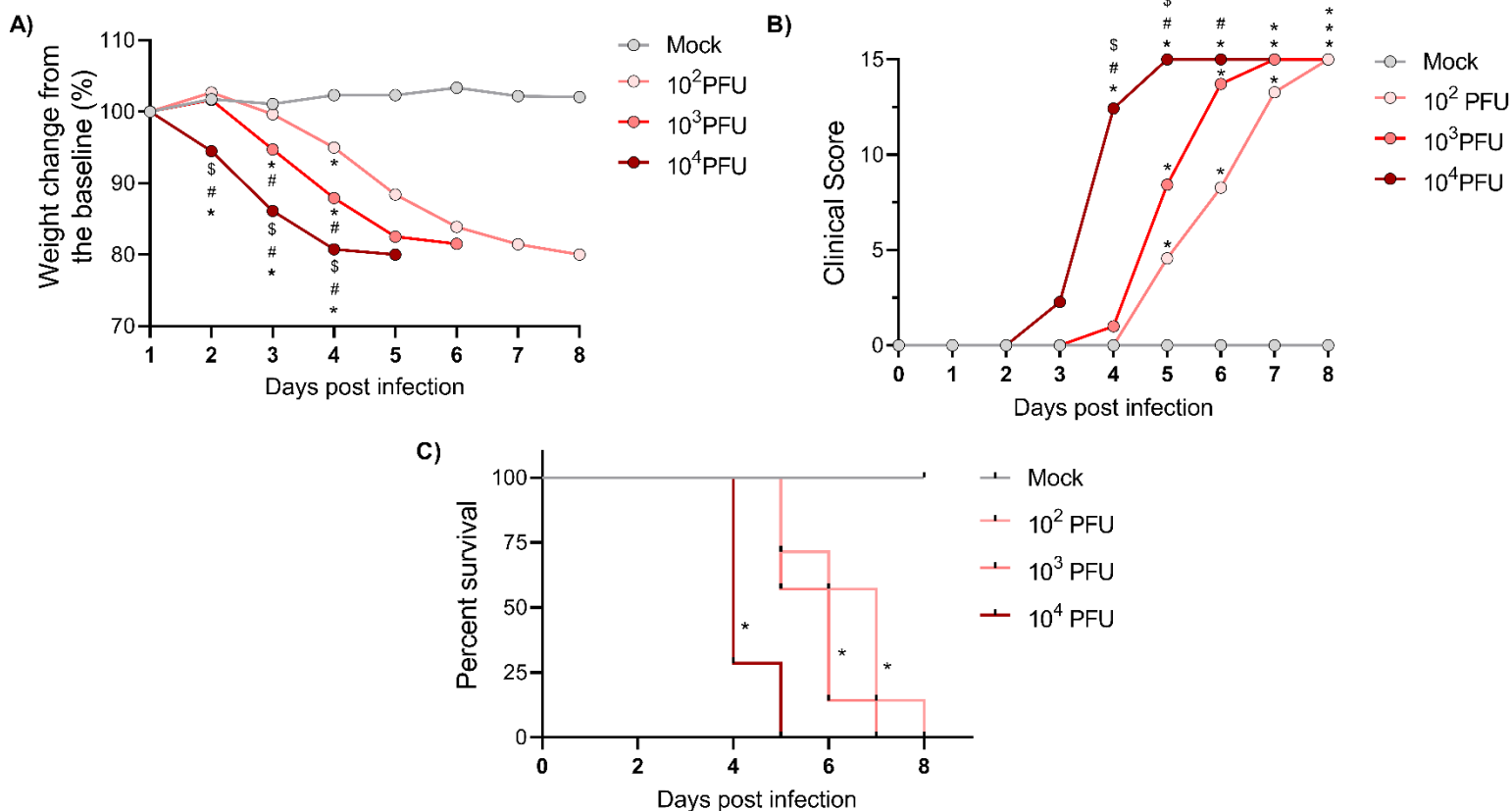


Figura 2. A infecção intranasal com MHV-3 induz sinais clínicos, perda de peso e mortalidade inóculo dependente. (A) Variação do peso dos animais infectados com MHV-3 em diferentes inóculos. **(B)** Graduação clínica dos animais infectados com MHV-3. **(C)** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais infectados com MHV-3. As análises de **(A)** e **(B)** foram realizadas pelo teste two-way ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. A análise de **(C)** foi realizada pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. * quando comparado ao grupo não infectado; # quando comparado ao grupo 3×10^2 PFU; \$ quando comparado ao grupo 3×10^3 PFU. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 7$.

4.2 O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz a lesão e os níveis de quimiocinas pulmonares na infecção por MHV-3 de modo dose dependente

Dando seguimento ao trabalho, nos propusemos a avaliar os efeitos do inibidor seletivo de PDE4, roflumilaste, na infecção com MHV-3. Para isso, os animais foram infectados com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados 2 dias após a infecção com dose de 1mg/kg ou 10 mg/kg de roflumilaste por via oral. Essa estratégia terapêutica foi adotada para que a resposta inflamatória, que é imperativa para o controle da infecção viral, não fosse cessada ou resolvida em sua fase produtiva. Dado que neste modelo o pico da lesão pulmonar ocorre no 3º dia após a infecção (ANDRADE e colab., 2021), este tempo foi escolhido para a eutanásia dos animais, coleta de tecidos e posteriores análises (**Figura 3**).

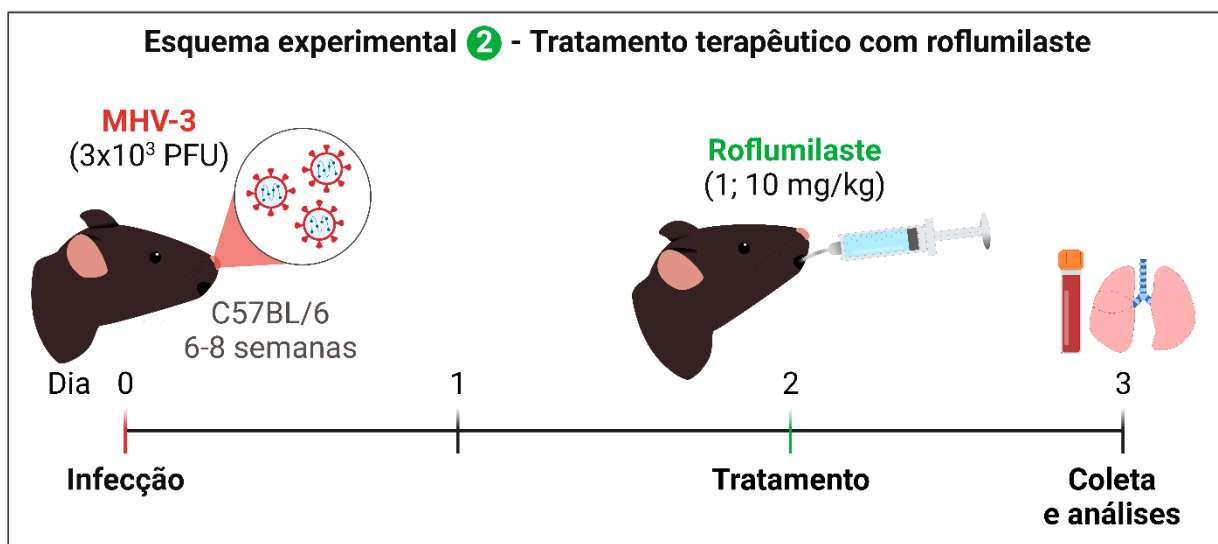


Figura 3. Esquema experimental 2: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados com roflumilaste (1 ou 10 mg/kg; dose única; oral) no 2º dia após a infecção e eutanasiados no 3º dia após a infecção. O sangue e o pulmão dos animais foram coletados para análises.

Quando comparados aos animais não infectados (**Figura 4A**), os animais infectados com MHV-3 não tratados apresentaram aumento do escore inflamatório pulmonar, caracterizado pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, presença células necróticas e hemorragia (**Figura 4B**). Os animais infectados com MHV-3 tratados com 1 mg/kg de roflumilaste apresentaram alterações teciduais semelhantes ao grupo infectado não tratado (**Figura 4C**). Enquanto isso, animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste apresentaram aspecto saudável do tecido pulmonar, semelhante ao observado em animais não

infectados (**Figura 4D**). Em uma análise semiquantitativa de escore inflamatório pulmonar, a totalidade dos animais infectados com MHV-3 não tratados apresentou lesão pulmonar de graduação leve, enquanto a maior parcela dos animais infectados e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste apresentaram recuperação do tecido pulmonar e ausência lesão (**Figura 4E-F**). Apesar dos efeitos anti-inflamatórios do roflumilaste, esta estratégia terapêutica não alterou a capacidade do hospedeiro em lidar com a infecção (*clearance* viral), de modo que os títulos virais pulmonares foram semelhantes entre animais infectados tratados ou não (**Figura 4G**).

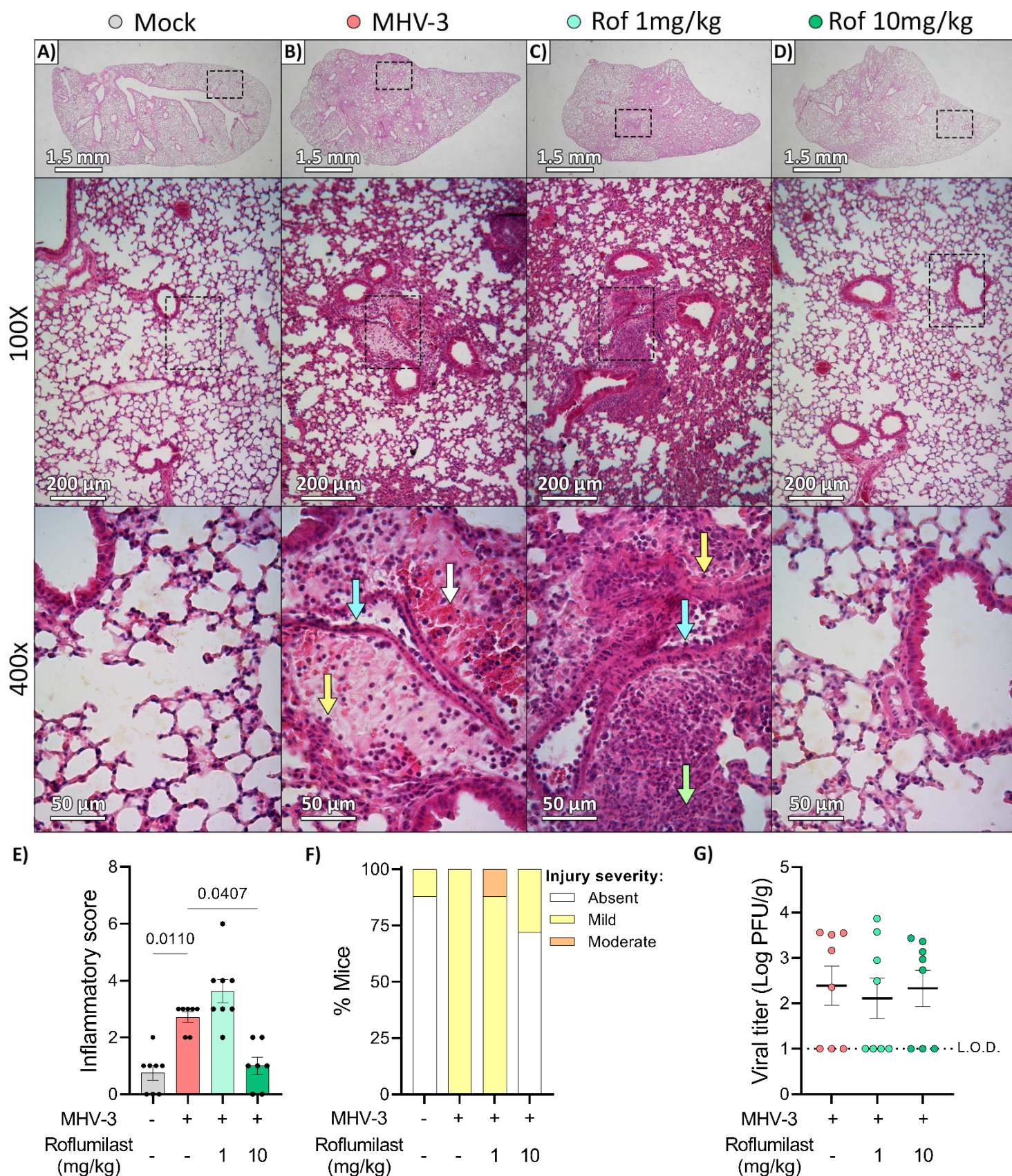


Figura 4. O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz a inflamação pulmonar após a infecção com MHV-3 de modo dose dependente. (A) Animais não infectados apresentaram aspecto saudável do tecido pulmonar. Animais infectados com MHV-3 não tratados (B) e animais infectados com MHV-3 e tratados com 1 mg/kg de roflumilaste (C) apresentaram leucócitos em interação com células endoteliais (seta azul), infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico (seta amarela), células necróticas (seta verde) e hemorragia (seta branca). (D) Animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste apresentaram aspecto pulmonar saudável. (E) Análise semiquantitativa de escore inflamatório pulmonar. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelos pós teste de Dunnett. (F) Porcentagem de animais de acordo com a graduação do escore inflamatório pulmonar. (G) Títulos virais pulmonares. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 8$.

Diante da melhora do escore inflamatório no tecido pulmonar de animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste, decidimos analisar o perfil de citocinas e quimiocinas. O tratamento terapêutico com roflumilaste na dose de 1 mg/kg não alterou os níveis das citocinas e quimiocinas pulmonares frente à infecção por MHV-3 (**Figura 5A-G**). Enquanto isso, o tratamento com roflumilaste na dose de 10 mg/kg reduziu os níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2, importantes para o recrutamento de neutrófilos e de monócitos, respectivamente (**Figura 5D-E**). Não houve alteração nos níveis de IL-1 β , IL-6, INF- γ e IL-10 e TGF- β com o tratamento com 10 mg/kg roflumilaste (**Figura 5A-C e F-G**).

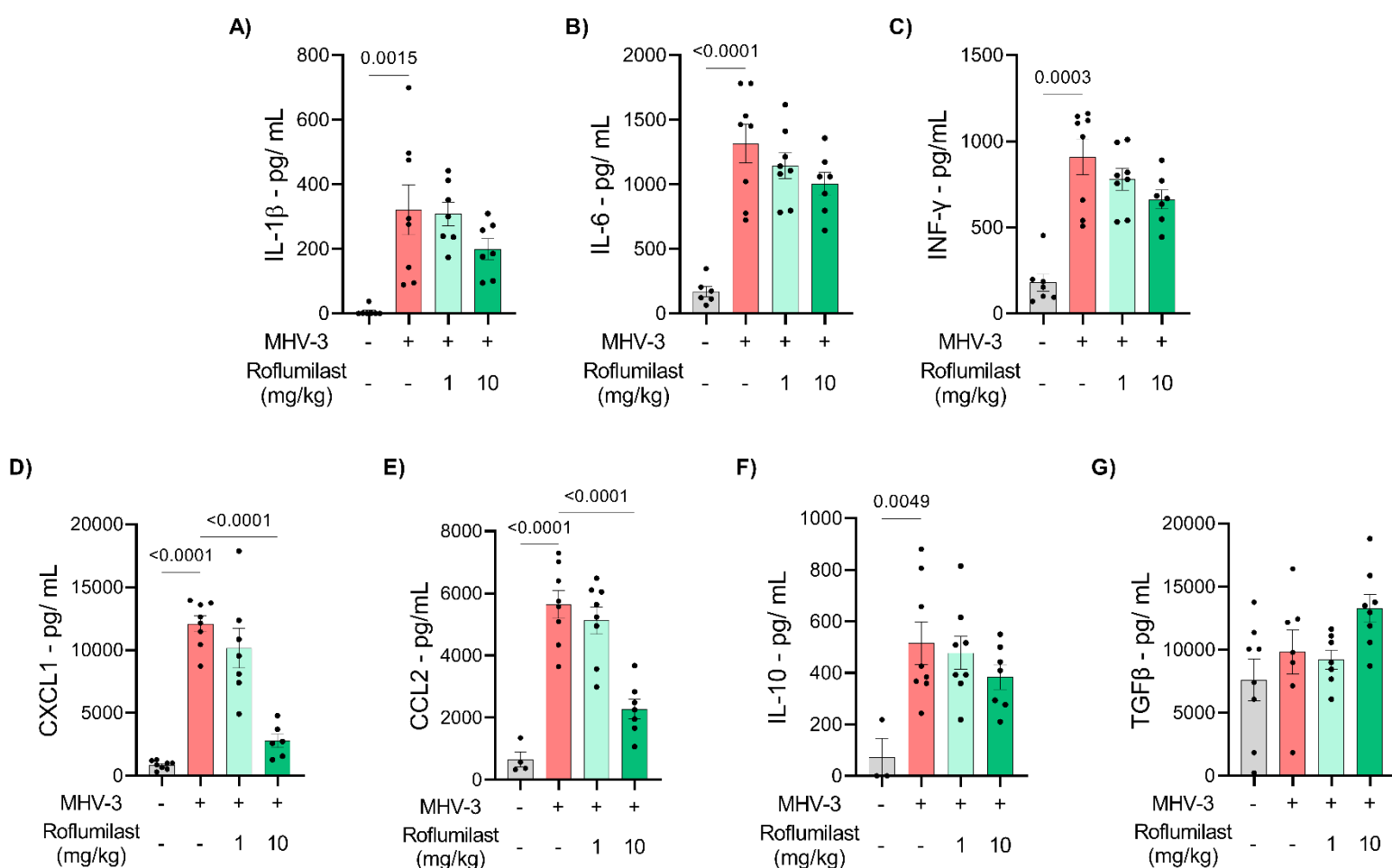


Figura 5. O tratamento terapêutico com roflumilaste reduz os níveis de quimiocinas pulmonares na infecção por MHV-3 de modo dose dependente. Níveis de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) INF- γ , (D) CXCL1, (E) CCL2, (F) IL-10 e (G) TGF β pulmonares medidos por ensaio de ELISA. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 7-8$.

Devido ao aumento dos níveis de CXCL1 no pulmão dos animais infectados com MHV-3, decidimos investigar se o infiltrado pulmonar de neutrófilos estaria alterado nestes animais através da marcação e quantificação de células Ly6G⁺ pela técnica de imuno-histoquímica. Quando comparados com animais não infectados (**Figura 6A**), os animais infectados com MHV-3 (**Figura 6B**) apresentaram aumento do acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar como um todo (**Figura 6E**) e nas regiões alveolares (**Figura 6F**), peribronquiolares (**Figura 6G**) e perivasculares (**Figura 6H**). O tratamento terapêutico com 1 mg/kg de roflumilaste (**Figura 6C**) ou 10 mg/kg de roflumilaste (**Figura 6D**) não reduziu o acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar dos animais infectados (**Figura 6E-H**). Apesar de não haver uma redução na quantificação de neutrófilos no pulmão dos animais tratados com 10 mg/kg de roflumilaste, nós observamos grandes focos de infiltrado neutrofílico em regiões peribronquiolares e perivasculares no pulmão de animais infectados com MHV-3 não tratados (**Seta amarela e Inseto da Figura 6B**) ou tratados com 1 mg/kg de roflumilaste (**Seta amarela e Inseto da Figura 6C**), enquanto este evento não foi constatado em nenhum dos animais tratados com 10 mg/kg de roflumilaste. Vale salientar que estes focos de infiltrado neutrofílico foram observados apenas em uma parcela dos animais infectados com MHV-3 não tratados ou tratados com 1 mg/kg de roflumilaste, o que gerou uma grande dispersão da contagem de células positivas para Ly6G nessas áreas.

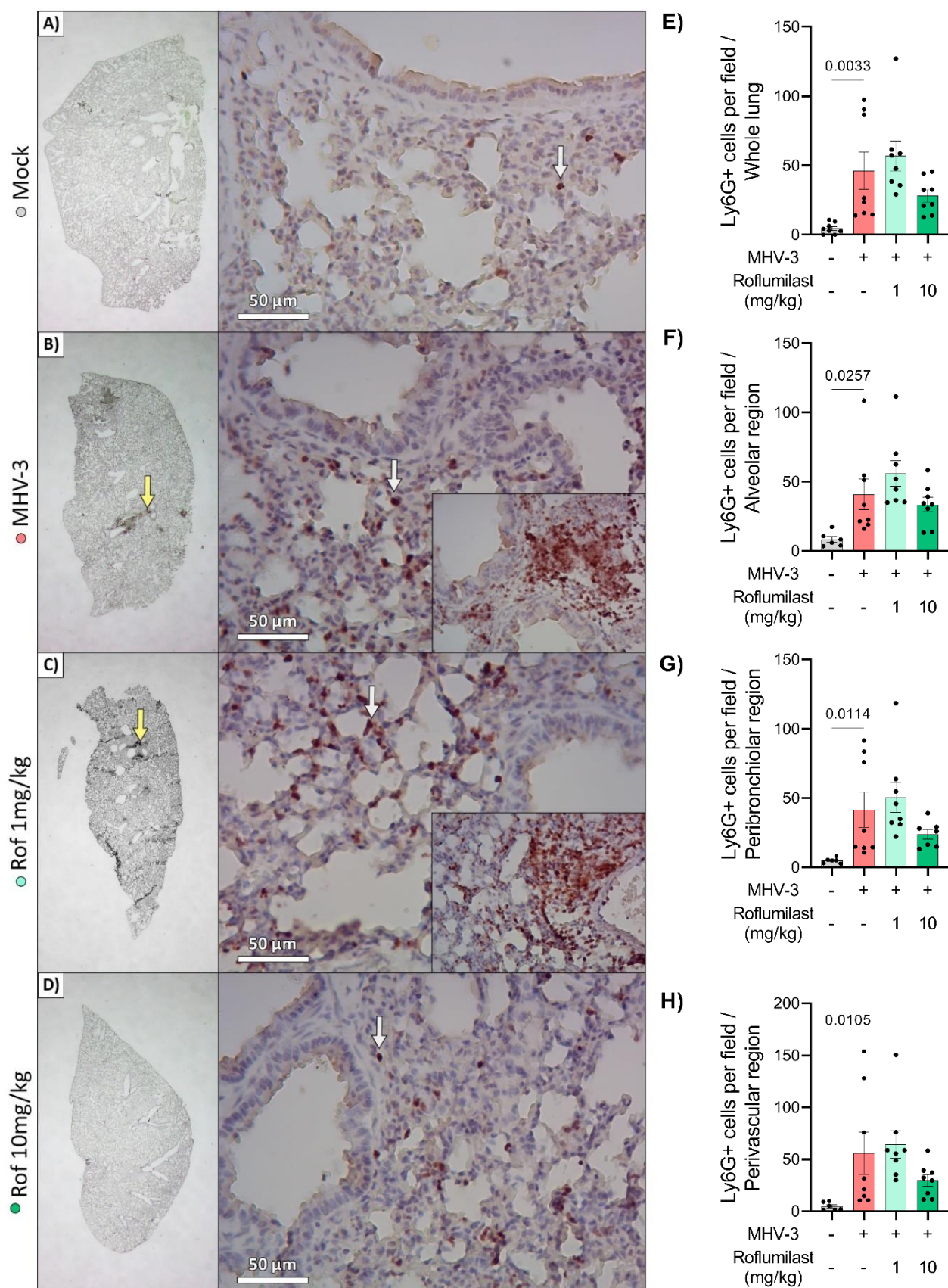


Figura 6. A infecção com MHV-3 promove o acúmulo de neutrófilos nas regiões alveolares, peribronquiolares e perivascularares do tecido pulmonar. Células Ly6G⁺ (seta branca) no tecido pulmonar de animais não infectados (A), animais infectados com MHV-3 não tratados (B), animais infectados com MHV-3 e tratados com 1 mg/kg de roflumilaste (C) e animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste (D). (B-C) Animais infectados com MHV-3 não tratados ou tratados com 1 mg/kg de roflumilaste apresentaram grandes focos de infiltrado neutrofílico em regiões peribronquiolares e perivascularares no pulmão (seta amarela e inserto). Quantificação do número de células Ly6G⁺ no tecido pulmonar como um todo (E) e nas regiões alveolares (F), peribronquiolares (G) e perivascularares (H). As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelos pós teste de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 6-8$.

4.3 O tratamento terapêutico com roflumilaste melhora as alterações hematológicas associadas à infecção por MHV-3

A COVID-19 é responsável por alterações hematológicas, como quadros de leucopenia, linfopenia, neutrofilia e trombocitopenia (RAHI e colab., 2021; TERPOS e colab., 2020), os quais estão associados ao mau prognóstico da doença. O modelo murino de infecção com MHV-3 mimetiza uma parcela destas alterações hematológicas observadas na COVID-19, visto que os animais infectados desenvolvem leucopenia e linfopenia (ANDRADE e colab., 2021). Assim, decidimos avaliar se o tratamento terapêutico com roflumilaste resultaria em melhora nestes parâmetros hematológicos. A infecção com MHV-3 não induziu alteração nos níveis de plaquetas circulantes (**Figura 7A**). Animais infectados com MHV-3 desenvolveram quadro de leucopenia (**Figura 7B**), resultante da diminuição do número de linfócitos circulantes (**Figura 7C**), enquanto não houve alteração nos níveis de neutrófilos circulantes (**Figura 7D**). A razão de neutrófilos por linfócitos é proposta como um marcador de gravidade e de mortalidade da COVID-19, visto que pacientes com COVID-19 grave e fatal aumento desta razão (CHAN e ROUT, 2020; TOORI e colab., 2021). Devido à diminuição dos níveis de linfócitos e à manutenção dos níveis de neutrófilos, animais infectados por MHV-3 apresentaram aumento da NLR (**Figura 7E**). Não houve alteração na quantidade de monócitos frente à infecção com MHV-3 (**Figura 7F**). Animais infectados com MHV-3 e tratados com a dose de 1mg/kg de roflumilaste apresentaram um quadro hematológico semelhante aos animais infectados não tratados (**Figura 7A-F**). Enquanto isso, animais tratados com 10 mg/kg roflumilaste reverteram o quadro de leucopenia e de linfopenia (**Figura 7B-C**) e tiveram aumento do número de neutrófilos circulantes (**Figura 7D**). A recuperação do número de linfócitos circulantes resultou na redução da NLR à valores basais, semelhante ao observado nos animais não infectados (**Figura 7E**). Ambos os tratamentos com roflumilaste, de 1 e de 10 mg/kg, não alteraram os níveis de monócitos (**Figura 7F**).

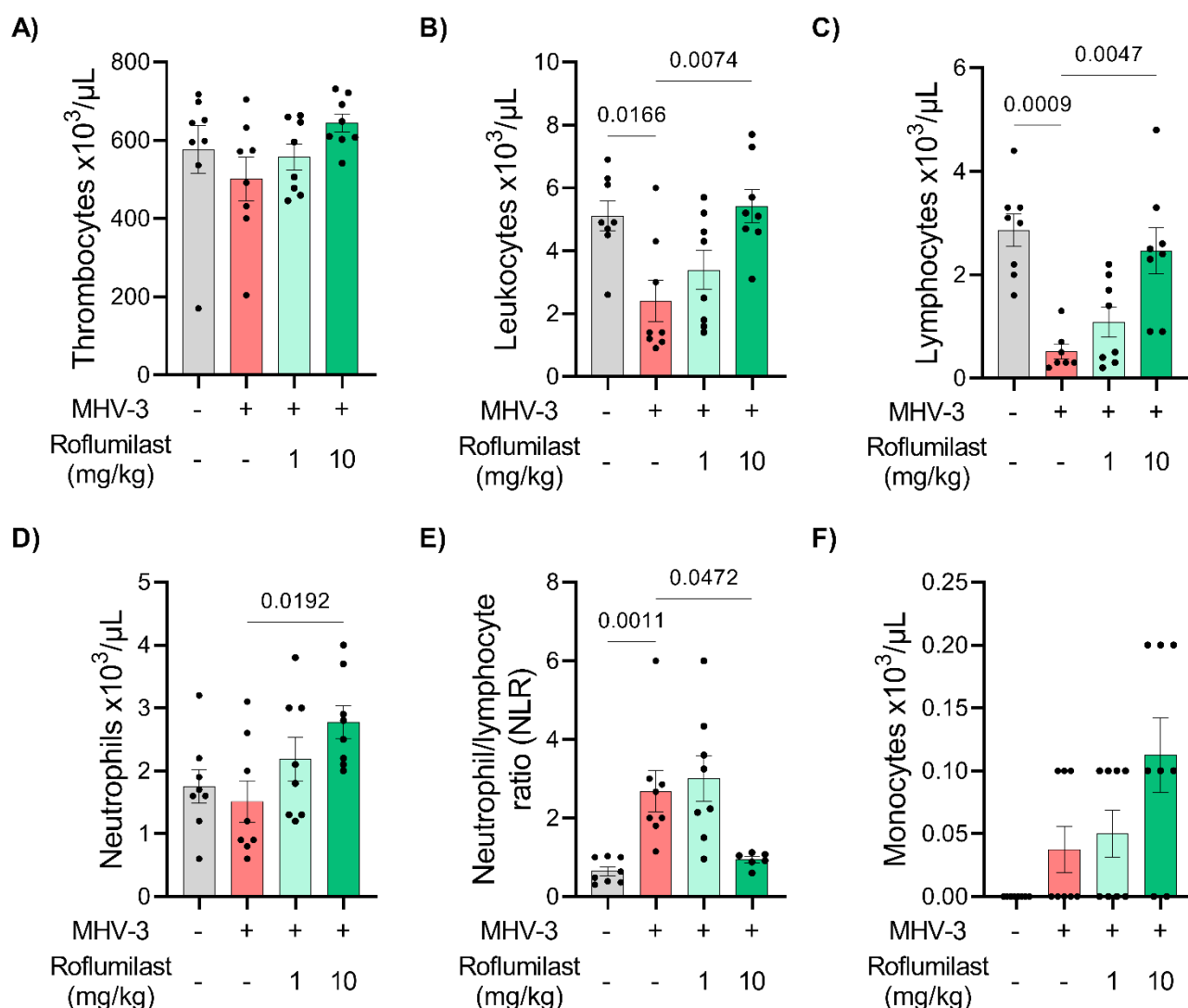


Figura 7. O tratamento terapêutico com roflumilaste melhora as alterações hematológicas associadas à infecção com MHV-3 de maneira dose dependente. Número de plaquetas (A), leucócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) circulantes. (E) Razão entre neutrófilos por linfócitos. (F) Número de monócitos. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 8$

4.4 O tratamento terapêutico com roflumilaste não altera parâmetros clínicos e sobrevivência da infecção com MHV-3

Em vista da melhora dos parâmetros pulmonares e hematológicos com o tratamento com roflumilaste na dose de 10 mg/kg, decidimos avaliar se esta dosagem teria efeito sob os parâmetros de perda de peso, graduação clínica e sobrevivência associados à infecção com MHV-3. Para isso, adotamos uma estratégia terapêutica

na qual o tratamento com roflumilaste foi iniciado 2 dias após a infecção e continuado diariamente até a mortalidade dos animais (**Figura 8**).

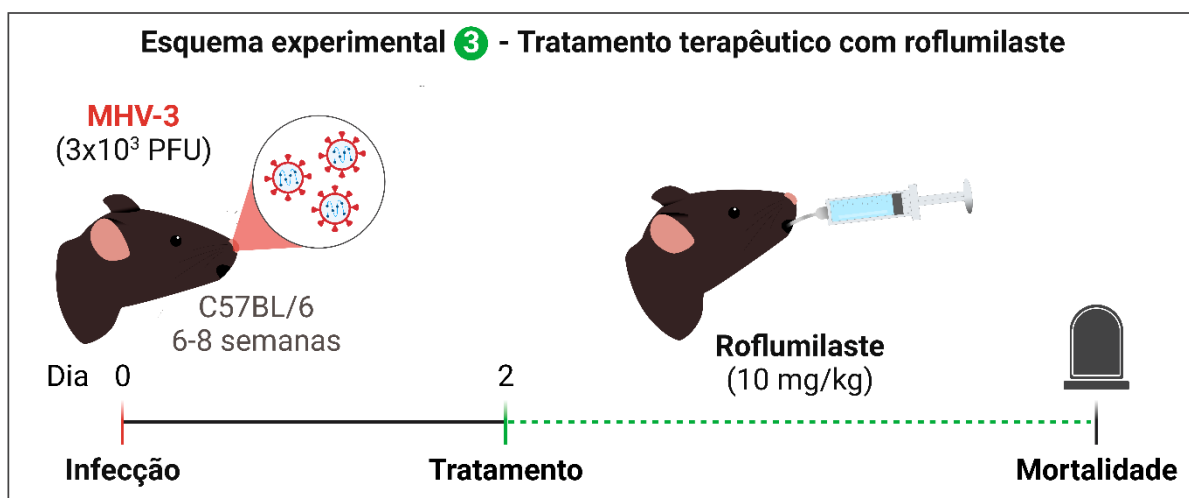


Figura 8. Esquema experimental 3: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros clínicos da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados diariamente com roflumilaste (10 mg/kg ; oral) ou veículo a partir do 2º dia após a infecção até a mortalidade. Os animais foram acompanhados para análises de perda de peso, escore clínico e sobrevivência.

Os animais infectados com MHV-3 não tratados apresentaram perda de peso a partir do 4º dia após a infecção (**Figura 9A**) e aumento do escore clínico a partir do 5º dia após a infecção (**Figura 9B**), quando comparados com animais não infectados. O tempo médio de sobrevivência do grupo infectado com MHV-3 não tratado foi de 6 dias após a infecção (**Figura 9C**). Animais infectados e tratados com roflumilaste apresentaram perda de peso semelhante aos animais não tratados (**Figura 9A**) e diminuição do escore clínico no 6º dia após a infecção (**Figura 9B**). Não houve diferença no tempo médio de sobrevivência entre animais infectados não tratados ou tratados com roflumilaste (**Figura 9C**).

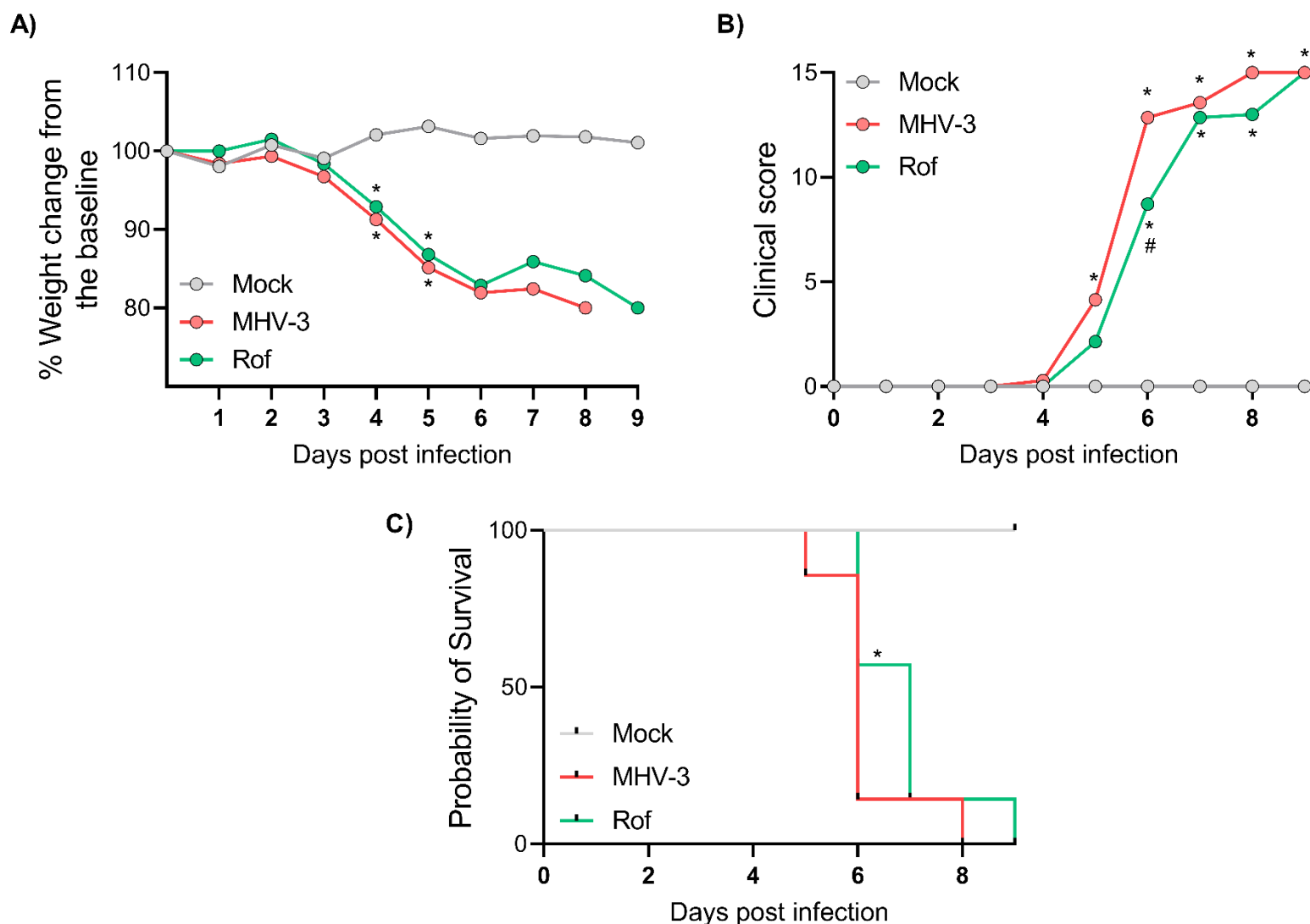


Figura 9. O tratamento terapêutico com roflumilaste não altera parâmetros clínicos da infecção com MHV-3. (A) Porcentagem da alteração do peso dos animais. **(B)** Escore clínico dos animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste. **(C)** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste. As análises de **(A)** e **(B)** foram realizadas pelo teste two-way ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. A análise de **(C)** foi realizada pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. * quando comparado ao grupo não infectado; # quando comparado ao grupo infectado com MHV-3 não tratado. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 4-7$.

4.5 A antecipação do tratamento terapêutico com roflumilaste prejudica a melhora da lesão pulmonar na infecção por MHV-3

Visto que a dose de 10 mg/kg de roflumilaste administrada 2 dias após a infecção com MHV-3 resultou em melhoras dos parâmetros inflamatórios pulmonares (**Figuras 4 e 5**) e hematológicos (**Figura 7**) associados à doença, decidimos investigar qual seria o efeito da antecipação deste tratamento, com o objetivo de aumentar a janela terapêutica e, conseqüentemente, o número de doses do medicamento. Para isso, os animais foram infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste (10 mg/kg;

oral) nos tempos de 1 e 2 dias após a infecção. Em seguida, 3 dias após a infecção, realizamos a eutanásia dos animais para coleta de tecidos e análises (**Figura 10**).

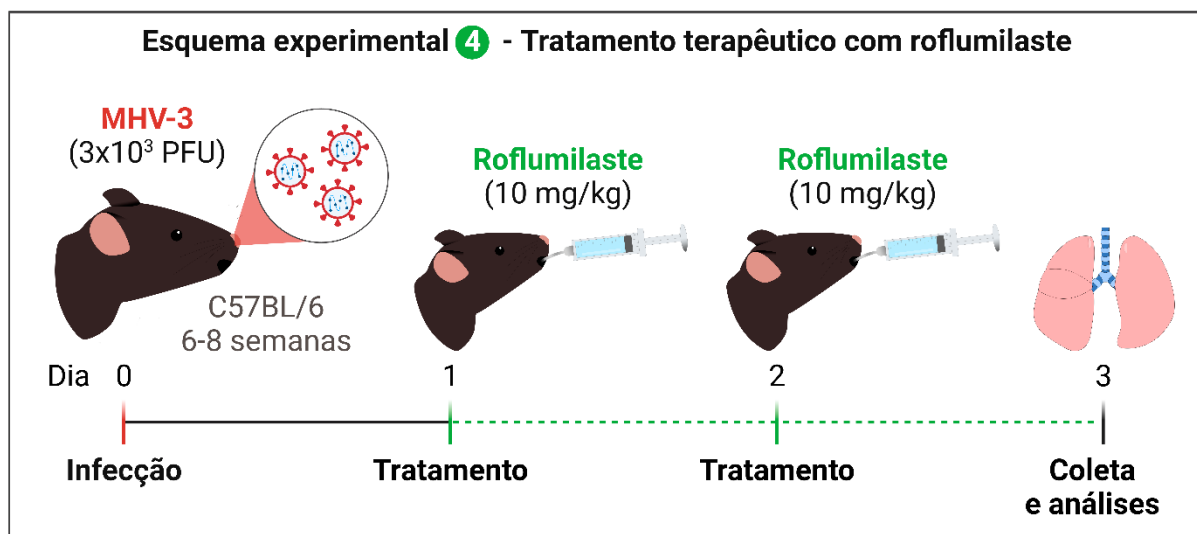


Figura 10. Esquema experimental 4: avaliação do tratamento terapêutico antecipado com roflumilaste nos parâmetros pulmonares da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados ou não com roflumilaste (10 mg/kg ; oral) no 1º e 2º dia após a infecção e eutanasiados no 3º dia após a infecção. O pulmão dos animais foi coletado para análises.

Quando comparados aos animais do grupo não infectado (**Figura 11A**), os camundongos infectados com MHV-3 apresentaram aumento do escore inflamatório pulmonar, caracterizado pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, presença células necróticas e hemorragia (**Figura 11B**). Os animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste apresentaram escore inflamatório pulmonar semelhante àquele observado nos animais infectados não tratados (**Figura 11C-E**). O tratamento terapêutico com roflumilaste resultou na diminuição dos níveis de CCL2, mas não alterou os níveis de IL-6, IL-1 β e CXCL1 (**Figura 11F-I**).

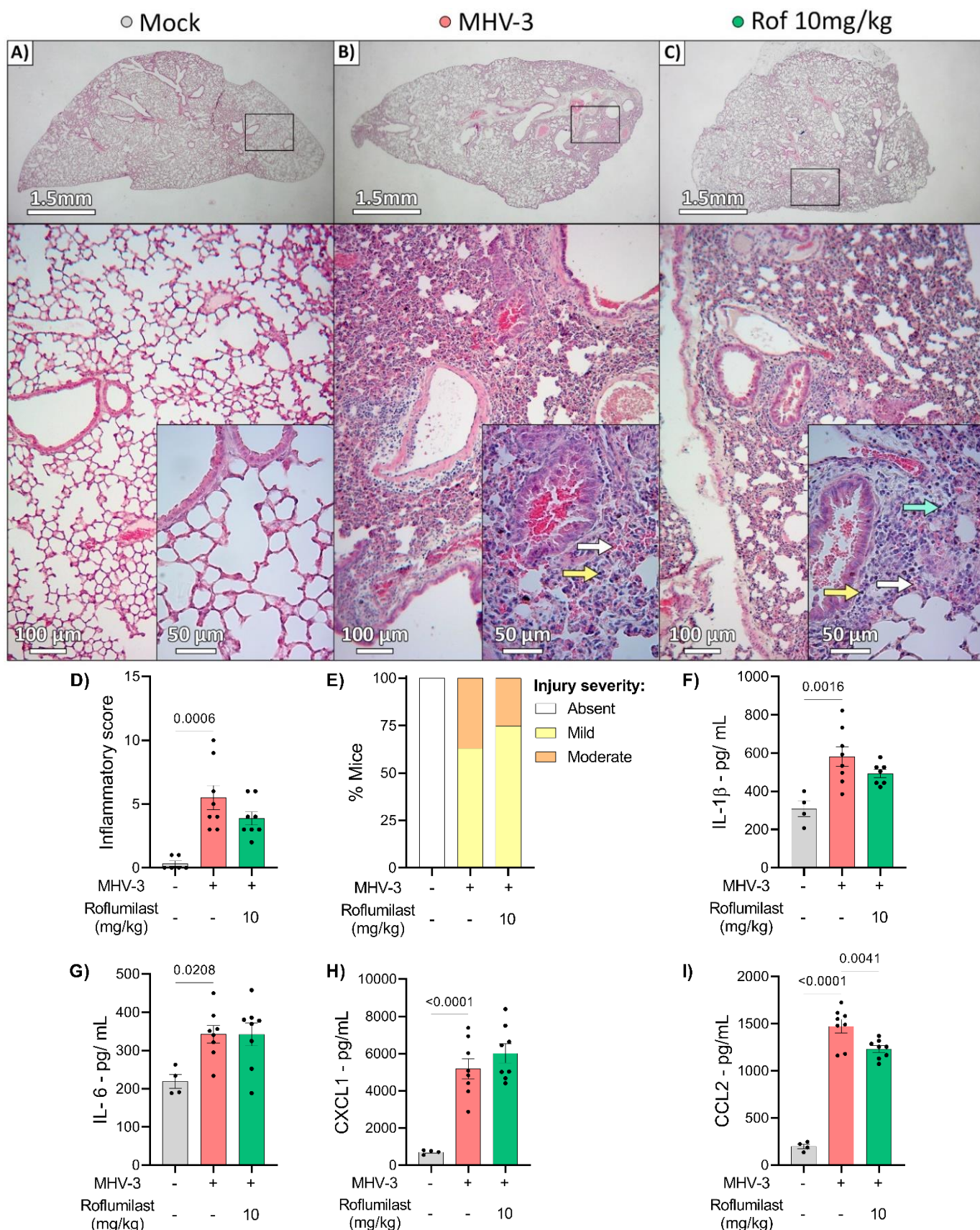


Figura 11. O tratamento terapêutico antecipado com roflumilaste não altera a lesão pulmonar da infecção com MHV-3. (A) Animais não infectados apresentaram aspecto saudável do tecido pulmonar. **(B-C)** Animais infectados com MHV-3 e animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste apresentaram leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico (seta amarela), células necróticas (seta verde) e hemorragia (seta branca). **(D)** Análise semiquantitativa de score histopatológico de inflamação. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelo pós teste de Dunnett. **(E)** Porcentagem de animais de acordo com a graduação do score histopatológico de inflamação. Nível pulmonares de **(F)** IL-1 β , **(G)** IL-6, **(H)** CXCL1 e **(I)** CCL2. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 4-8$.

4.6 O tratamento profilático com roflumilaste promove maior lesão pulmonar na infecção por MHV-3

Em seguida, decidimos investigar qual o efeito do tratamento profilático com roflumilaste na lesão pulmonar frente à infecção com MHV-3. Para isso, o tratamento com roflumilaste (10 mg/kg; oral) foi iniciado 1 hora antes da infecção com MHV-3 e continuado diariamente. Realizamos a eutanásia dos animais no 3º dia após a infecção para coleta de tecidos e análises (**Figura 12**).

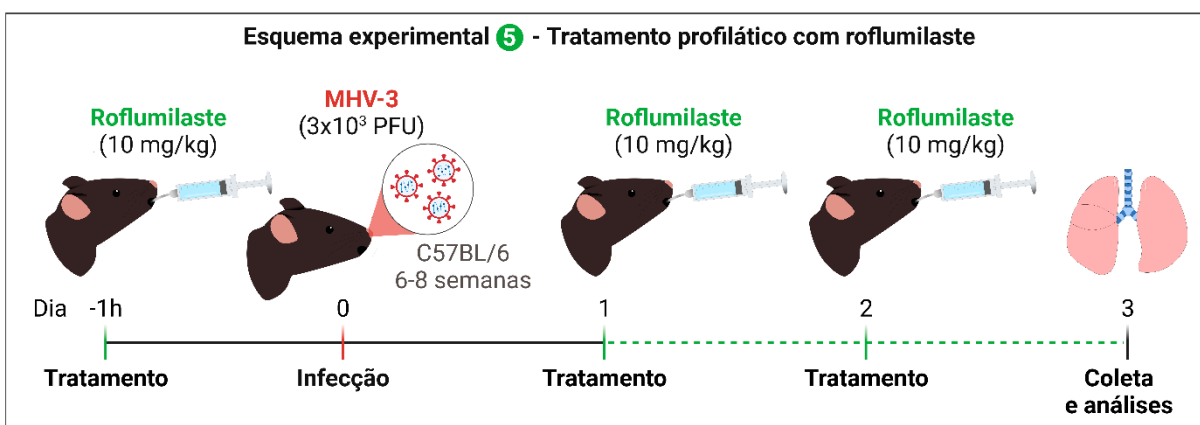


Figura 12. Esquema experimental 5: avaliação do tratamento profilático com roflumilaste nos parâmetros clínicos da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados com roflumilaste (10 mg/kg; oral) 1 hora antes e no 1º e 2º dia após a infecção e eutanasiados no 3º dia após a infecção. O pulmão dos animais foi coletado para análises.

Animais infectados com MHV-3 apresentaram escore inflamatório pulmonar leve à moderado, caracterizado pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, células necróticas e hemorragia (**Figura 13B e D-E**). Enquanto isso, os animais tratados profilaticamente com roflumilaste e infectados com MHV-3 apresentaram uma maior gravidade de escore inflamatório pulmonar, com presença de grandes focos de morte celular (**Figura 13C-E**). A infecção com MHV-3 elevou os níveis pulmonares da citocina IL-1 β e da quimiocina CCL2, enquanto não houve alteração nos níveis de IL-6 e CXCL1. O tratamento profilático com roflumilaste não alterou os níveis das citocinas e quimiocinas pulmonares frente à infecção com MHV-3 (**Figura 13F-I**).

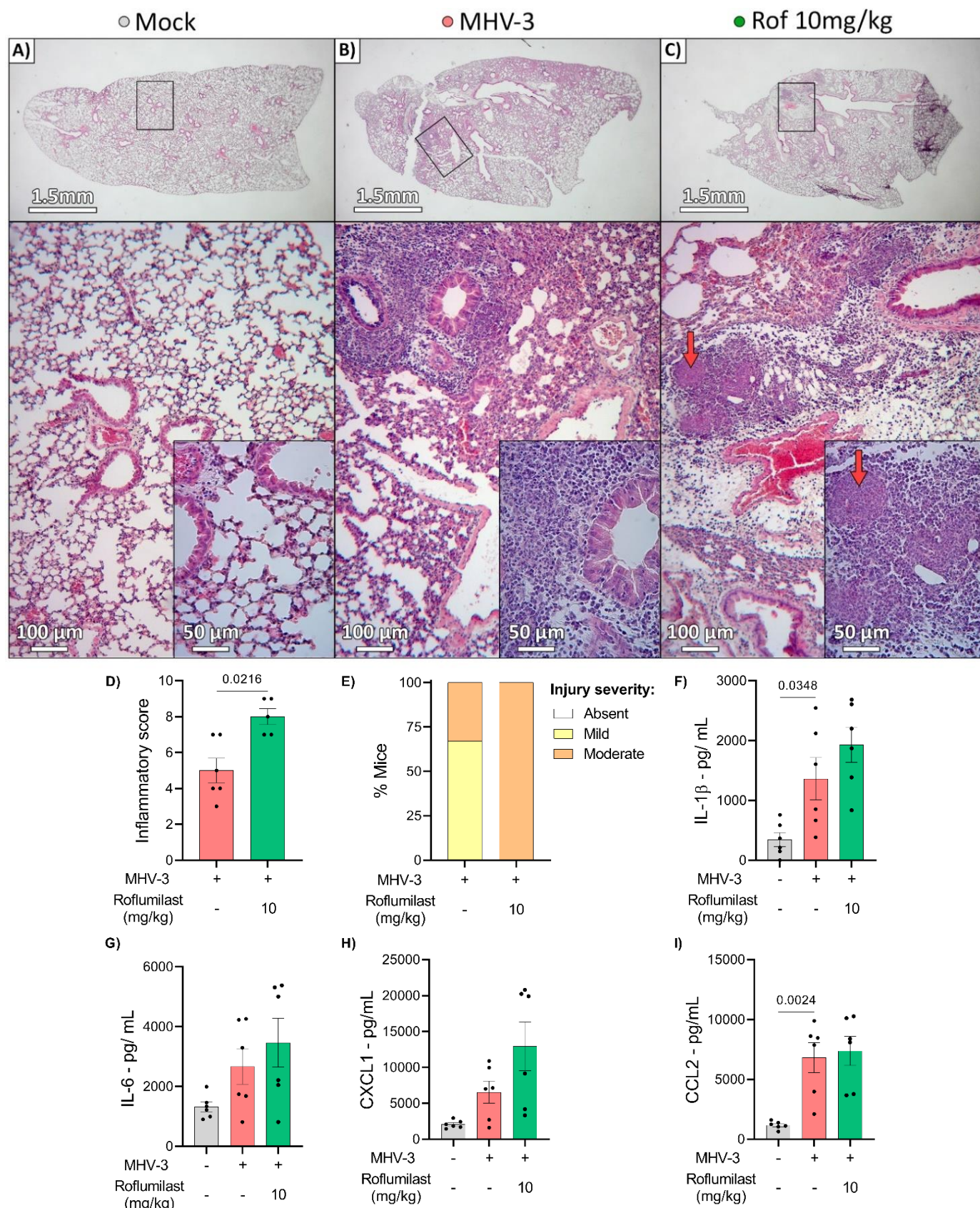


Figura 13. O tratamento profilático com roflumilaste promove maior lesão pulmonar frente à infecção por MHV-3. (A) Animais não infectados. **(B)** Animais infectados com MHV-3 apresentaram leucócitos em interação com endotélio, infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico, células necróticas e hemorragia. **(C)** Animais infectados com MHV-3 tratados profilaticamente com roflumilaste apresentaram grandes focos de morte celular (seta vermelha). **(D)** Análise semiquantitativa de score histopatológico de inflamação. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelo pós teste de Dunnett. **(E)** Porcentagem de animais de acordo com a graduação do score histopatológico de inflamação. Nível pulmonar das citocinas e quimiocinas **(F)** IL-1 β , **(G)** IL-6, **(H)** CXCL1 e **(I)** CCL2. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 6$.

4.7 O tratamento com dexametasona não altera a lesão pulmonar frente à infecção com MHV-3

Um conceito que vem ganhando notoriedade é o efeito sinérgico ou aditivo de drogas para tratamento de doenças inflamatórias. Neste sentido, em um modelo de asma neutrofílica foi demonstrado que o roflumilaste e a dexametasona possuem efeito anti-inflamatório sinérgico (PARK e colab., 2022). Vale a pena ressaltar que dexametasona é um glicocorticoide já utilizado como tratamento para pacientes com COVID-19 grave (P e colab., 2021). Em vista deste panorama, decidimos avaliar se ambas as drogas, roflumilaste e dexametasona, também possuem efeito anti-inflamatório sinérgico em modelo de infecção por coronavírus murino. Para isso, primeiramente realizamos uma dose resposta do tratamento com dexametasona com a finalidade de identificar uma dose sem efeitos anti-inflamatórios na doença e, posteriormente, combiná-la com o roflumilaste para avaliar os efeitos da conjugação. Devido aos dados anteriores, referentes às diferentes estratégias temporais de tratamento adotadas com o roflumilaste, decidimos administrar o tratamento com dexametasona no 2º dia após a infecção.

Os animais foram infectados com 3×10^3 PFU de MHV-3, tratados com 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg de dexametasona por via intraperitoneal e eutanasiados 3 dias após a infecção para coleta de tecido pulmonar e sangue (**Figura 14**).

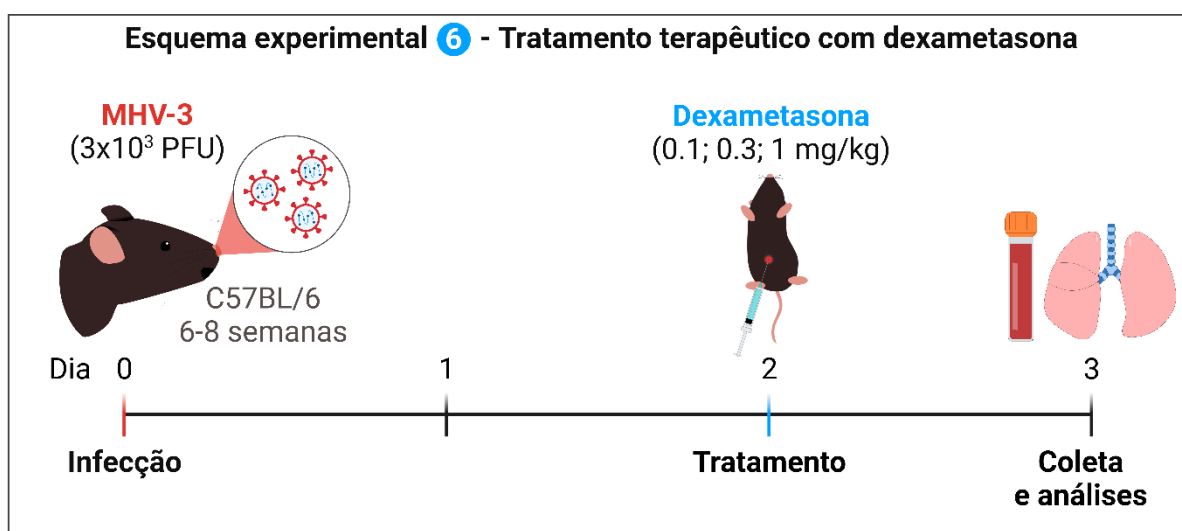


Figura 14. Esquema experimental 6: avaliação do tratamento terapêutico com dexametasona nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados com dexametasona (0,1, 0,3 ou 1 mg/kg; dose única; intraperitoneal) no 2º dia após a infecção e eutanasiados no 3º dia após a infecção. O sangue e o pulmão dos animais foram coletados para análises.

Quando comparados aos animais não infectados (**Figura 15A**), os animais infectados com MHV-3 não tratados apresentaram aumento do escore inflamatório pulmonar, caracterizado pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, presença células necróticas e hemorragia (**Figura 15B**). Animais infectados com MHV-3 e tratados com 0,1, 0,3 e 1 mg/kg de dexametasona apresentaram escore inflamatório pulmonar semelhante ao grupo infectado não tratado (**Figura 15C-E**). Em uma análise semiquantitativa de escore inflamatório, os animais infectados com MHV-3 não tratados ou tratados dexametasona, nas 3 diferentes dosagens, apresentaram lesão pulmonar leve à moderada (**Figura 15F**).

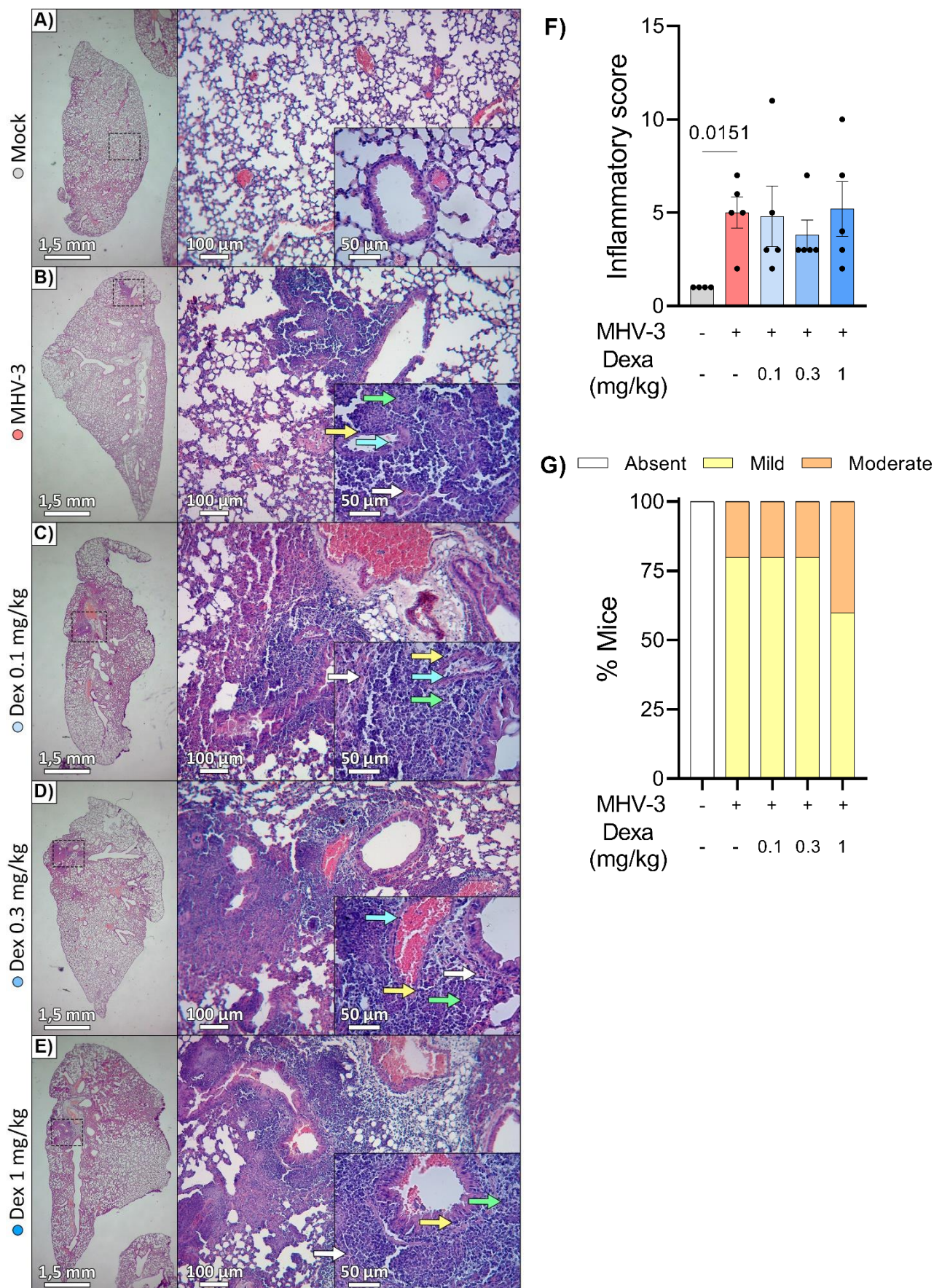


Figura 15. O tratamento com dexametasona não altera a lesão pulmonar frente à infecção com MHV-3. (A) Animais não infectados apresentaram aspecto saudável do tecido pulmonar. Animais infectados com MHV-3 não tratados (B), animais infectados com MHV-3 e tratados com 0,1 mg/kg (C), 0,3 mg/kg (D) e 1 mg/kg (E) de dexametasona apresentaram leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares (seta amarela), infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico (seta azul), células necróticas (seta verde) e hemorragia (seta branca). (F) Análise semiquantitativa de escore inflamatório. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelos pós teste de Dunnett. (G) Porcentagem de animais de acordo com a graduação do escore inflamatório. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5$.

4.8 O tratamento terapêutico com dexametasona recupera a linfopenia associada à infecção por MHV-3

A infecção com MHV-3 não promoveu alteração nos níveis de plaquetas e de leucócitos totais circulantes (**Figura 16A-B**). Enquanto isso, os animais infectados com MHV-3 apresentaram linfopenia, neutrofilia e, consequentemente, aumento da razão entre neutrófilos por linfócitos (**Figura 16C-E**). Animais infectados com MHV-3 e tratados com 0,1 mg/kg de dexametasona apresentaram alterações hematológicas semelhantes aos animais infectados e não tratados (**Figura 16A-E**). Enquanto isso, animais tratados com 0,3 e 1 mg/kg de dexametasona tiveram recuperação dos níveis de linfócitos circulantes (**Figura 16C**).

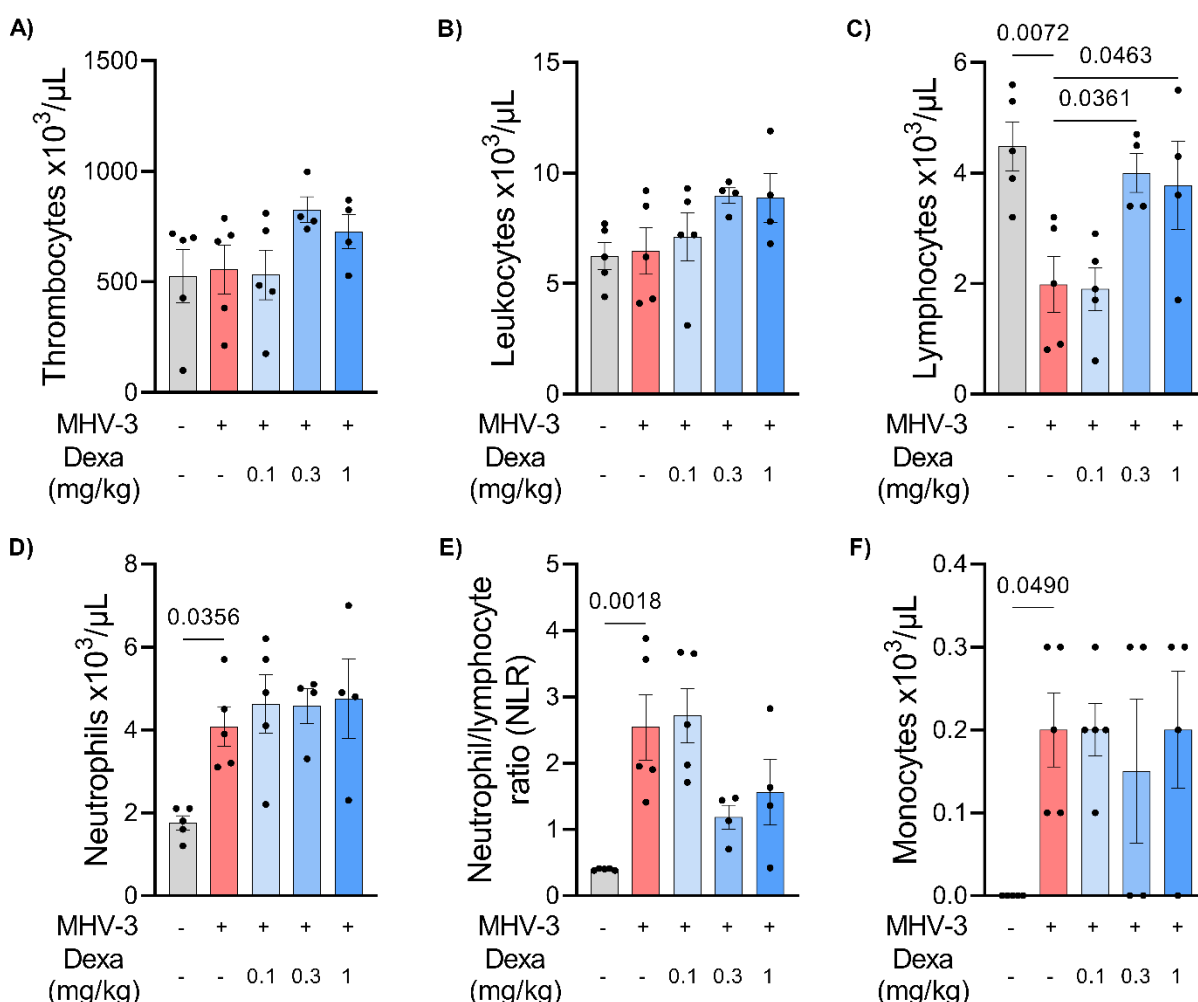


Figura 16. O tratamento terapêutico com dexametasona recupera a linfopenia associada à infecção por MHV-3. Número de plaquetas (A), leucócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) circulantes. (E) Razão entre neutrófilos por linfócitos. Número de monócitos (F). As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5$.

4.9 O tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona melhora a lesão pulmonar na infecção por MHV-3

Devido à ineficácia da dosagem de 0,1 mg/kg de dexametasona em melhorar parâmetros pulmonares e hematológicos na infecção com MHV-3 (**Figuras 15 e 16**), decidimos utilizá-la para o tratamento combinado com roflumilaste e investigar se o uso de ambas as drogas poderia melhorar a doença. Neste sentido, escolhemos a dosagem de 1 mg/kg de roflumilaste, a qual também se demonstrou ineficaz na melhora de parâmetros pulmonares e hematológicos associados à infecção com MHV-3 (**Figuras 4-7**), para o tratamento combinado. Para isso, infectamos animais com 3×10^3 PFU de MHV-3 e realizamos o tratamento conjugado com 1 mg/kg de roflumilaste, por via oral, e 0,1 mg/kg de dexametasona, por via intraperitoneal, 2 dias após a infecção. Os animais foram eutanasiados no 3º dia após a infecção para coleta de tecido pulmonar e sangue (**Figura 17**).

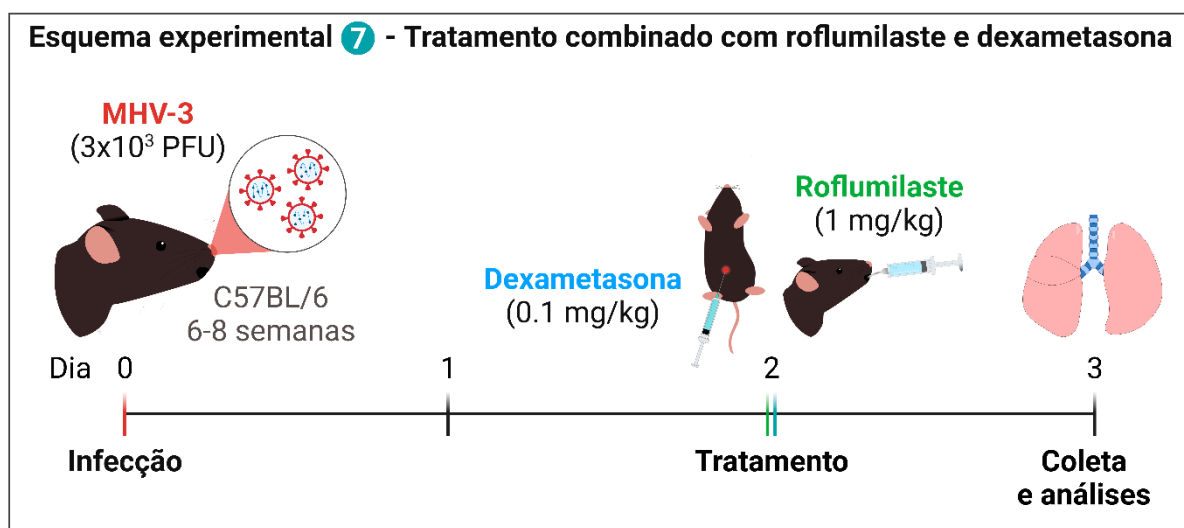


Figura 17. Esquema experimental 7: avaliação do tratamento terapêutico combinado de roflumilaste e dexametasona nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-3. Camundongos C57BL/6 foram infectados via intranasal com 3×10^3 PFU de MHV-3 e tratados com roflumilaste (1 mg/kg; dose única; oral) e dexametasona (0,1 mg/kg; dose única; intraperitoneal) no 2º dia após a infecção e eutanasiados no 3º dia após a infecção. O sangue e o pulmão dos animais foram coletados para análises.

Os animais infectados com MHV-3 não tratados apresentaram lesão pulmonar leve, caracterizada pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, presença células necróticas e hemorragia (**Figura 18B**). Os animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste e dexametasona (**Figura 18C**) apresentaram diminuição do escore inflamatório pulmonar (**Figura 18D**), com uma parcela dos animais ausentes de lesão pulmonar (**Figura 18E**).

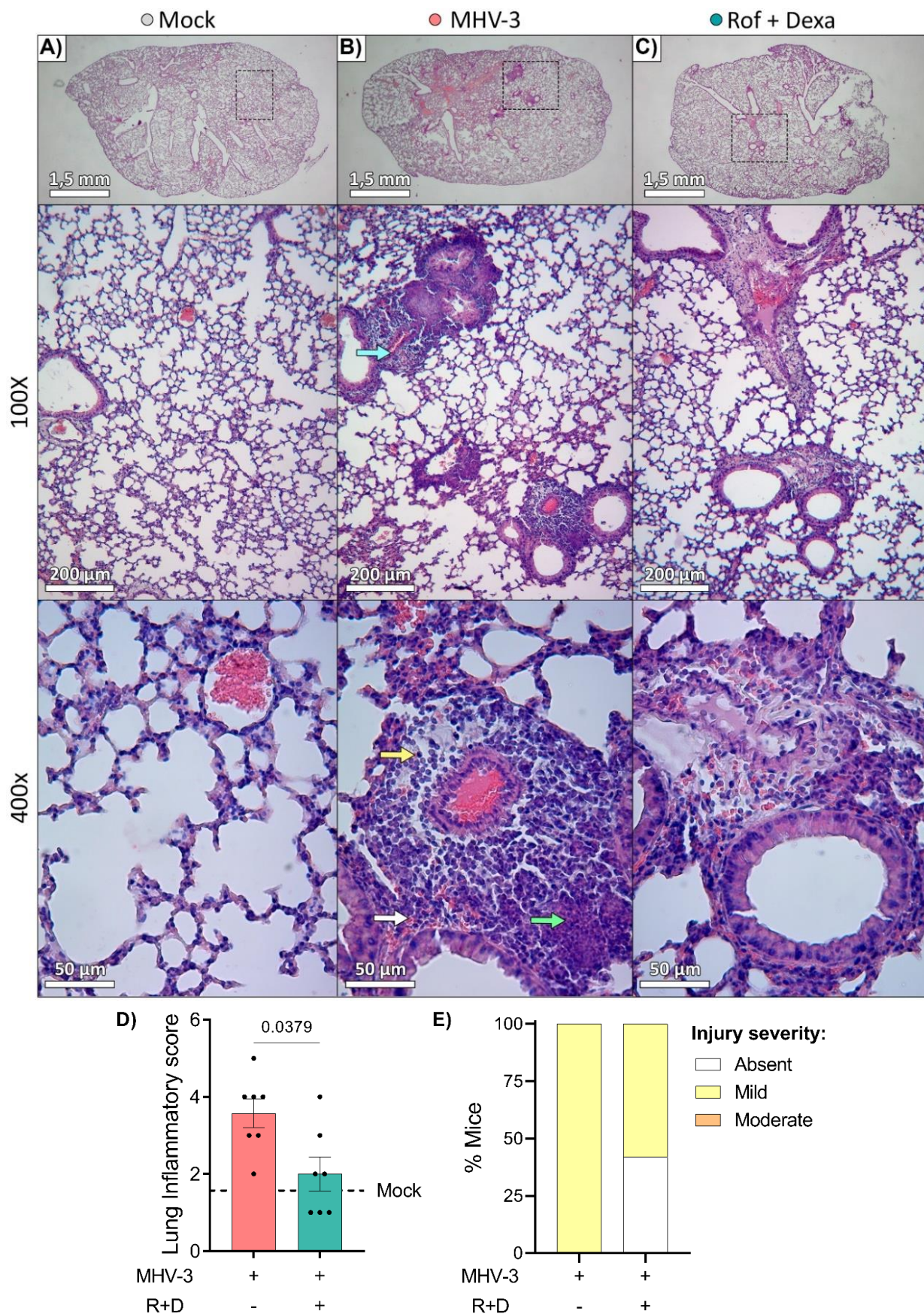


Figura 18. O tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona melhora a lesão pulmonar na infecção por MHV-3. (A) Animais não infectados. Animais infectados com MHV-3 não tratados (B) apresentaram leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares (seta azul), infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico (seta amarela), células necróticas (seta verde) e hemorragia (seta branca). Animais infectados com MHV-3 e tratados com 1mg/kg de roflumilaste e 0,1 mg/kg de dexametasona (C) apresentaram diminuição do escore inflamatório pulmonar. (D) Análise semiquantitativa de escore histopatológico de inflamação. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelos pós teste de Dunnett. (E) Porcentagem de animais de acordo com a graduação do score histopatológico de inflamação. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 7$.

4.10 A infecção com MHV-A59 – Caracterização de um modelo de COVID-19 leve.

Em seguida, decidimos avaliar quais seriam os efeitos do tratamento com roflumilaste na infecção intranasal por outro betacoronavirus, o MHV-A59. Primeiramente, caracterizamos o modelo de infecção com o MHV-A59, o qual ainda não tinha sido estudado no laboratório. Para isso, camundongos C57BL/6 de 5 semanas foram infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59 por via intranasal e foram acompanhados para avaliação da perda de peso e escore clínico durante 60 dias. Além disso, foram realizadas eutanásias nos dias 2, 5, 8, 11, 16, 30 e 60 após infecção para coleta de tecido pulmonar, hepático, de sangue e de lavado broncoalveolar (**Figura 19**).

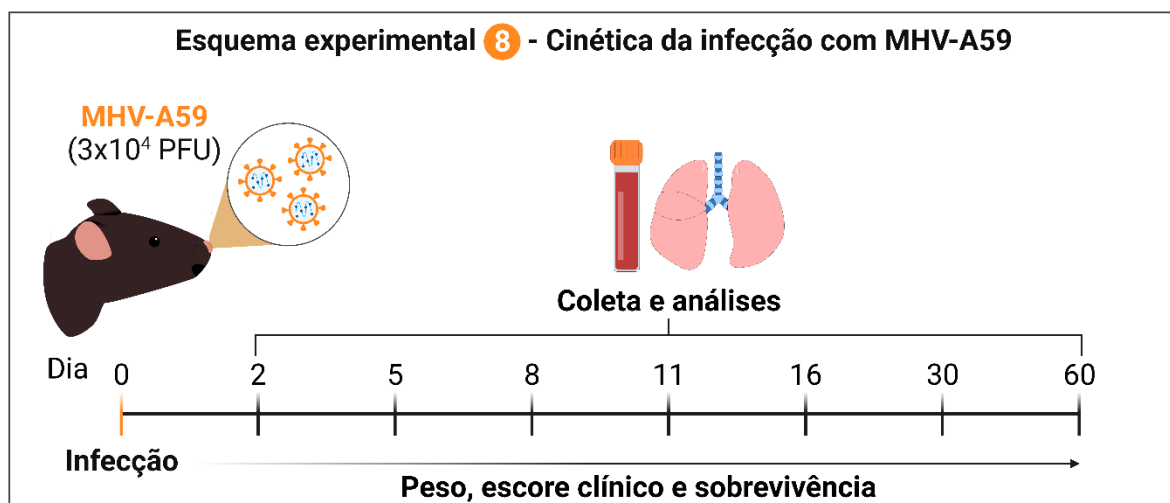


Figura 19. Esquema experimental 8: cinética da infecção com MHV-A59. Camundongos C57BL/6 de 5 semanas foram infectados com 3×10^4 PFU de MHV-A59 e acompanhados durante 60 dias para avaliação da perda de peso, escore clínico e sobrevivência. Os animais foram eutanasiados 2, 5, 8, 11, 16, 30 e 60 dias após a infecção para coleta dos tecidos pulmonar, hepático, sangue e lavado broncoalveolar.

Os animais infectados com MHV-A59 tiveram redução do peso corporal do 4º ao 16º dia após a infecção (**Figura 20A**) e aumento do escore clínico do 7º ao 10º dia após a infecção, quando comparados aos animais não infectados (**Figura 20B**). A manifestação dos sinais clínicos foi leve nos animais infectados, particularmente pelo eriçamento do pelo e curvatura da região dorsal. A infecção com MHV-A59 não induziu mortalidade aos animais (**Figura 20C**).

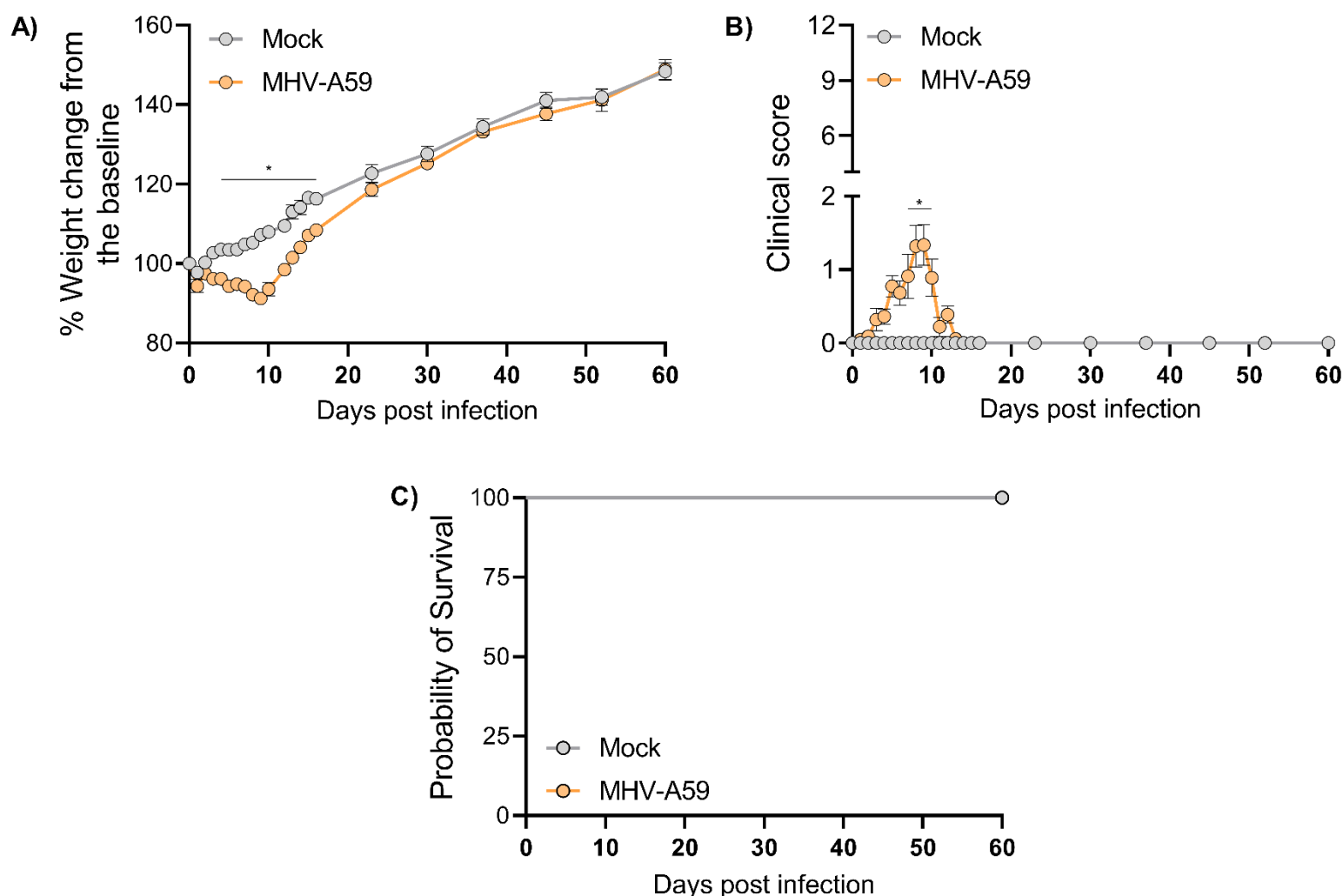


Figura 20. A infecção com MHV-A59 promove sinais clínicos leves. (A) Variação do peso dos animais infectados com MHV-A59 com inóculo de 3×10^4 PFU. **(B)** Graduação clínica dos animais infectados com MHV-A59. **(C)** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais infectados com MHV-A59. As análises de **(A)** e **(B)** foram realizadas pelo teste two-way ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. A análise de **(C)** foi realizada pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 6$.

4.11 A infecção com MHV-A59 está associada a recuperação localizada de títulos virais e lesão pulmonar autolimitada

Os animais infectados com MHV-A59 apresentaram uma infecção pulmonar autolimitada caracterizada por uma cinética de *clearance* viral. Neste sintoma, a carga viral pulmonar teve seu pico no 2º dia após a infecção, apresentou decaimento no 5º dia após a infecção e foi indetectável no 8º dia após a infecção pelo ensaio de titulação viral (**Figura 21A**). Quando comparados com animais não infectados (**Figura 21B**), os camundongos infectados com MHV-A59 demonstraram lesão pulmonar leve, caracterizada por infiltrado perivascular e peribrônquico, descamação de células bronquiolares, leucócitos em processo de morte celular e pontos de hemorragia (**Figura 21C**). A lesão pulmonar foi observada a partir do 2º dia após a infecção, teve

o seu pico no 5º dia após a infecção e gradual decaimento até o 30º dia após a infecção, tempo o qual todos os animais tiveram recuperação do tecido pulmonar e diminuição do escore inflamatório à níveis basais (**Figura 21D-E**).

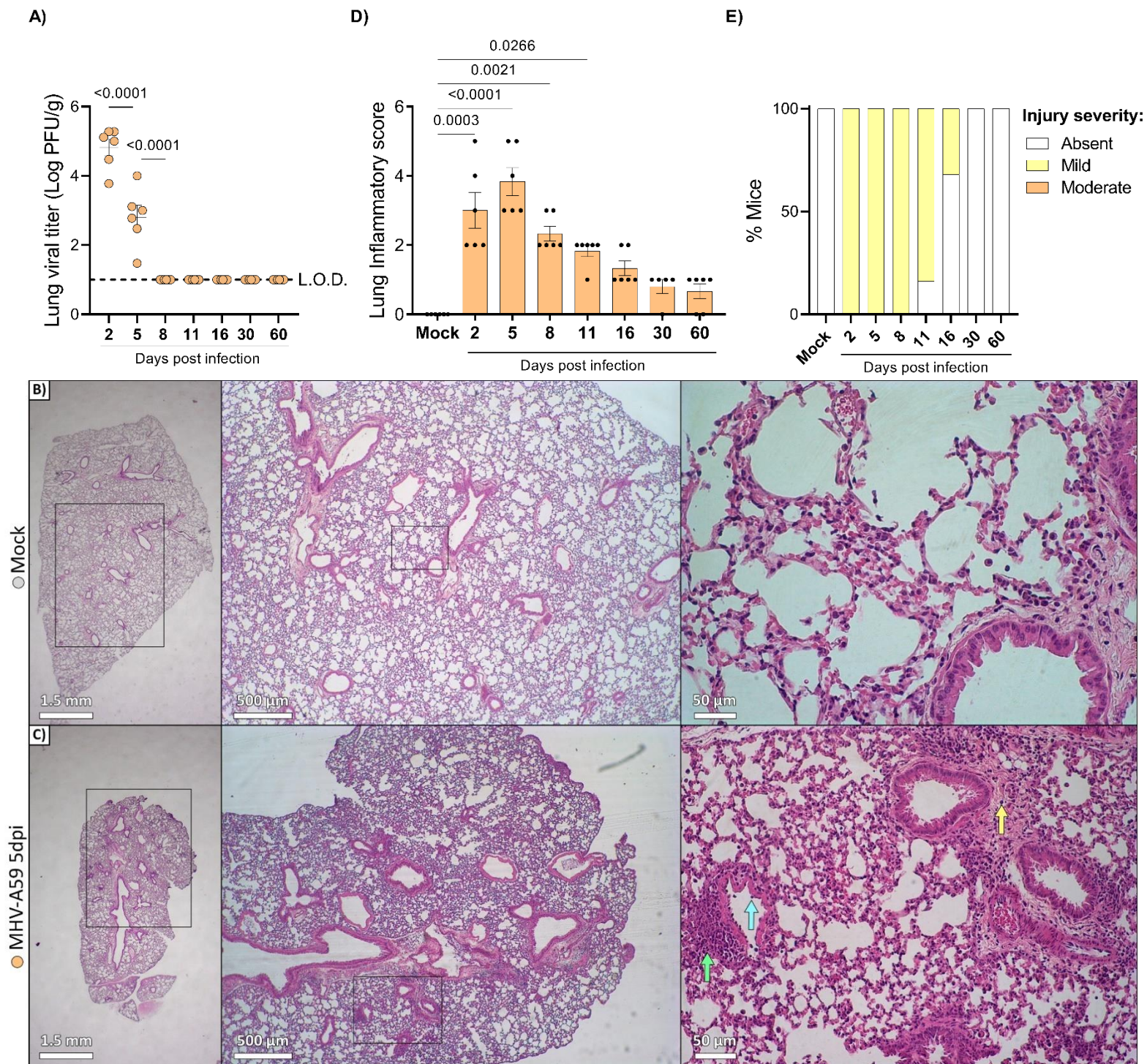


Figura 21. A infecção com MHV-A59 promove títulos virais e lesão pulmonar autolimitados. (A) Títulos virais pulmonares. **(B)** Animais não infectados apresentaram aspecto pulmonar saudável. **(C)** Animais infectados com MHV-A59 apresentaram leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares (seta azul), infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico (seta amarela), células necróticas (seta verde), hemorragia e descamação de células bronquiolares. **(D)** Análise semiquantitativa de escore inflamatório pulmonar. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelo pós teste de Dunnett. **(E)** Porcentagem de animais de acordo com a graduação do escore inflamatório. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5-6$.

Devido às processo inflamatório pulmonar evidenciado pela análises histológicas, decidimos avaliar se mediadores inflamatórios estariam alterados no pulmão de animais infectados com MHV-A59. Na análise de citocinas pró-inflamatórias, a infecção com MHV-A59 induziu a síntese de TNF do 5° ao 60° dia após a infecção (**Figura 22A**), aumentou os níveis de IL-1 β no 8° e no 16° dia após a infecção (**Figura 22B**) e de IL-6 no 8° dia após a infecção (**Figura 22C**), enquanto não teve efeito nos níveis pulmonares INF- γ (**Figura 22D**). Na análise de quimiocinas, o MHV-A59 induziu o aumento de CXCL1 no 2°, 5° e 8° dia após a infecção (**Figura 22E**), de CCL2 no 2 e 5° dia após a infecção (**Figura 22F**), de CCL3 no 2°, 5° e 8° dia após a infecção (**Figura 22G**) e de CCL5 no 2°, 5° e 8° dia após a infecção (**Figura 22H**). Na análise de citocinas anti-inflamatórias e/ou regulatórias, a infecção com MHV-A59 não alterou os níveis de IL-10 (**Figura 22I**), enquanto os níveis de TGF β tiveram aumento em pontos mais tardios da doença, no 8°, 16° e no 30° dias após a infecção (**Figura 22J**).

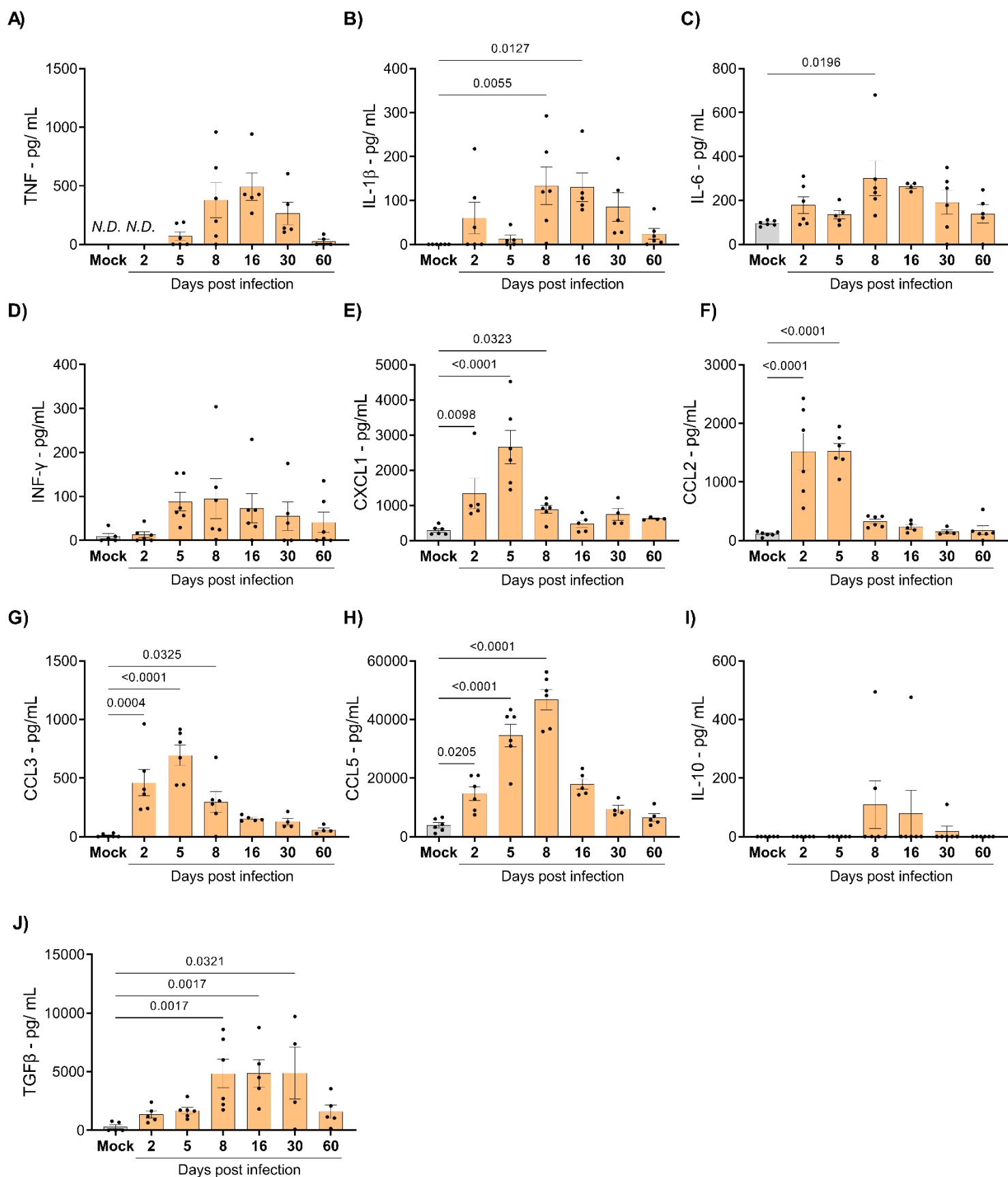


Figura 22. A infecção com MHSV-A59 promove aumento dos níveis de citocinas e quimiocinas pulmonares. Níveis pulmonares de (A) TNF, (B) IL-1 β , (C) IL-6, (D) INF- γ , (E) CXCL1, (F) CCL2, (G) CCL3, (H) CCL5, (I) IL-10 e (J) TGF β medidos por ensaio de ELISA. As análises foram realizadas pelo teste two-way ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5-6$.

O aumento de TGF β pode sugerir a deposição de colágeno no tecido pulmonar dos animais infectados, visto que esta é uma citocina essencial na regulação da deposição de fibrose (MENG e colab., 2016). Entretanto, no pontos tardios de 30 e 60 dias após a infecção, os animais infectados com MHV-A59 apresentaram acúmulo de colágeno no tecido pulmonar semelhante aos animais não infectados pela análise de lâminas histológicas coradas com Tricrômico de Masson (**Figura 23**).

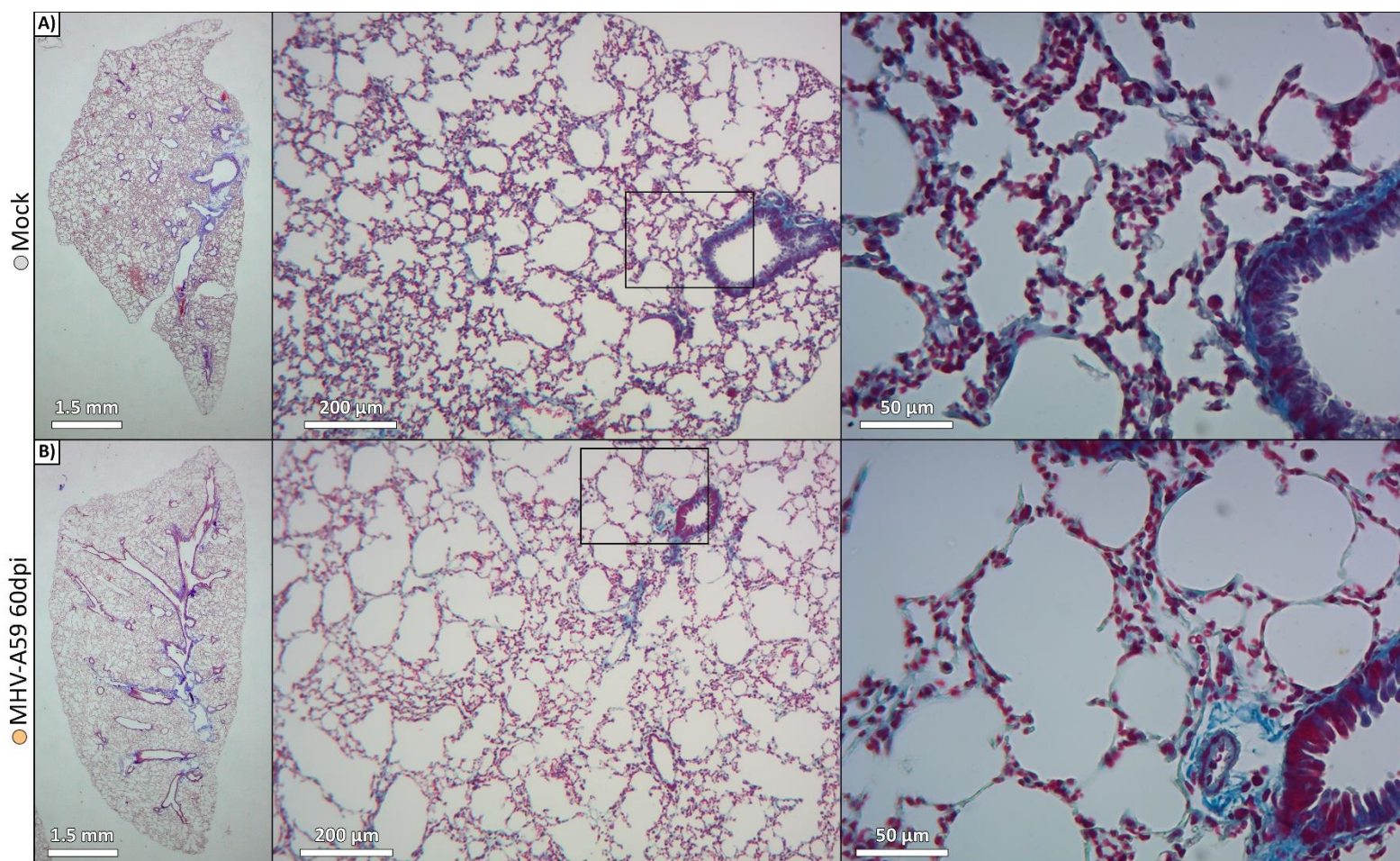


Figura 23. A infecção com MHV-A59 não altera a deposição de colágeno no pulmão dos animais infectados. Coloração com tricrômico de Masson do pulmão de animais não infectados (**A**) e de animais infectados com MHV-A59 60 dias após a infecção (**B**).

4.12 A infecção com MHV-A59 está associada a recuperação localizada de títulos virais e lesão hepática autolimitados

Para investigar as consequências sistêmicas da infecção intranasal com o MHV-A59, decidimos avaliar os títulos virais no tecido hepático, esplênico e no plasma ao longo da cinética de infecção. Houve detecção de carga viral no tecido hepático no 5º dia após a infecção, enquanto não houve detecção de vírus viáveis no baço e no plasma pelo ensaio de titulação viral (**Figura 24A**). Concomitante com a presença de títulos virais, o tecido hepático dos animais infectados com MHV-A59 apresentou

aumento do escore histopatológico no 5º dia após a infecção quando comparado aos animais não infectados (**Figura 24B-C**). A lesão hepática dos animais infectados com MHV-A59 foi considerada leve, caracterizada por dispersos focos de necrose, e teve sua recuperação completa no 16º dia após a infecção, tempo o qual todos os animais tiveram recuperação do tecido hepático e diminuição do escore histopatológico à níveis basais (**Figura 24D-E**).

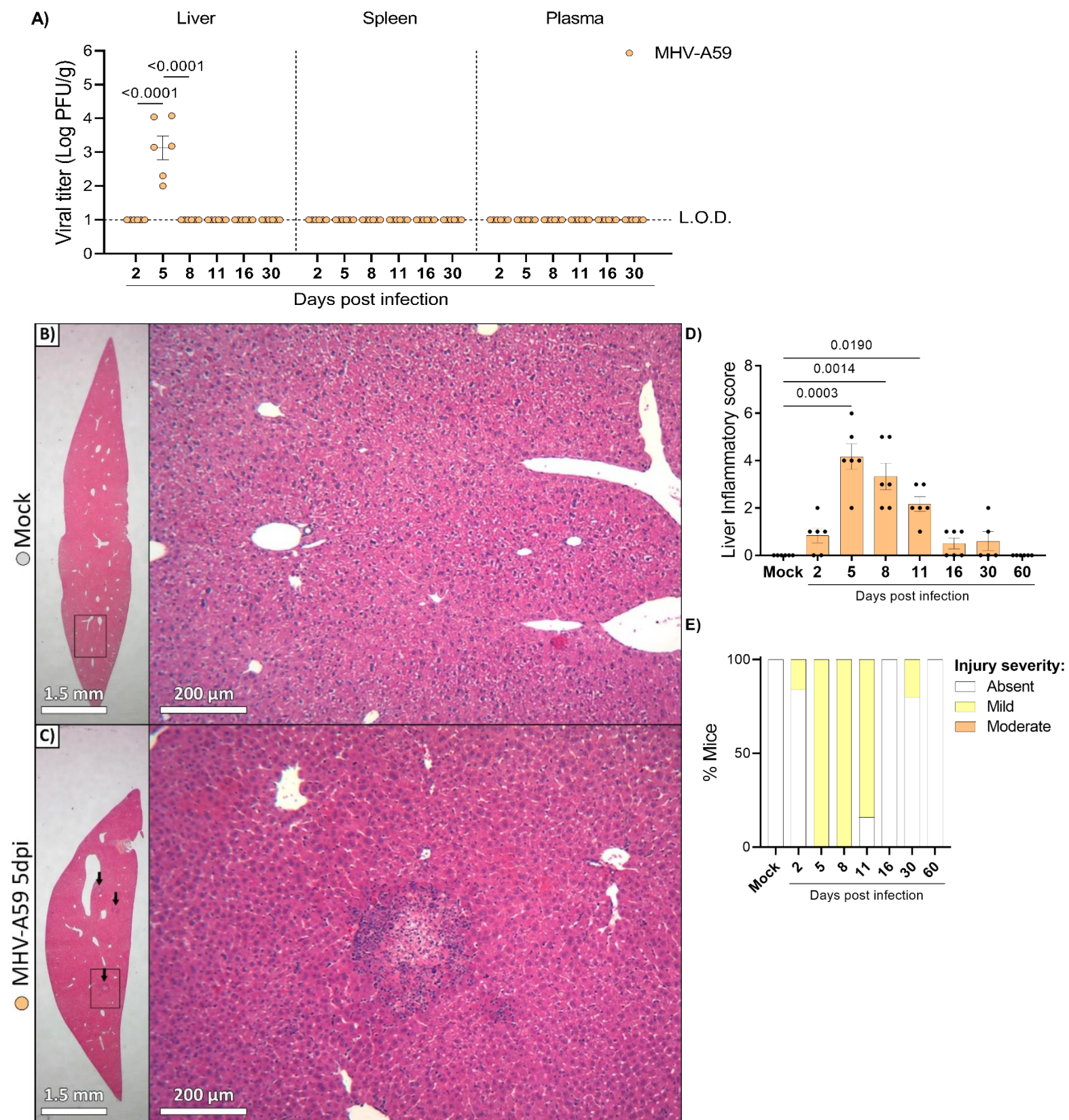


Figura 24. A infecção com MHV-A59 promove títulos virais e lesão hepática autolimitados. (A) Títulos virais hepáticos, esplênicos e plasmáticos. **(B)** Animais não infectados apresentaram aspecto hepático saudável. **(C)** Animais infectados com MHV-A59 apresentaram dispersos focos de necrose (setas pretas). **(D)** Análise semiquantitativa de escore inflamatório hepático. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelo pós teste de Dunnett. **(E)** Porcentagem de animais de acordo com a graduação do escore inflamatório. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5-6$.

4.13 A infecção com MHV-A59 induz alterações hematológicas

Em seguida, avaliamos parâmetros hematológicos dos animais infectados com MHV-A59. A infecção com MHV-A59 não alterou os níveis de plaquetas circulantes (**Figura 25A**). Enquanto isso, animais infectados com MHV-A59 apresentaram leucopenia no 2° e no 5° dia após a infecção (**Figura 25B**), consequência de um quadro de linfopenia (**Figura 25C**). Além disso, no 8° dia após a infecção os animais infectados apresentaram aumento dos níveis de neutrófilos circulantes (**Figura 25D**). Com a inicial diminuição do número de linfócitos e o posterior aumento do número de neutrófilos circulantes, a NLR permaneceu elevada do 2° ao 8° dia após a infecção com MHV-A59 (**Figura 25E**). Não houve alteração no número de monócitos frente à infecção com MHV-A59 (**Figura 25F**).

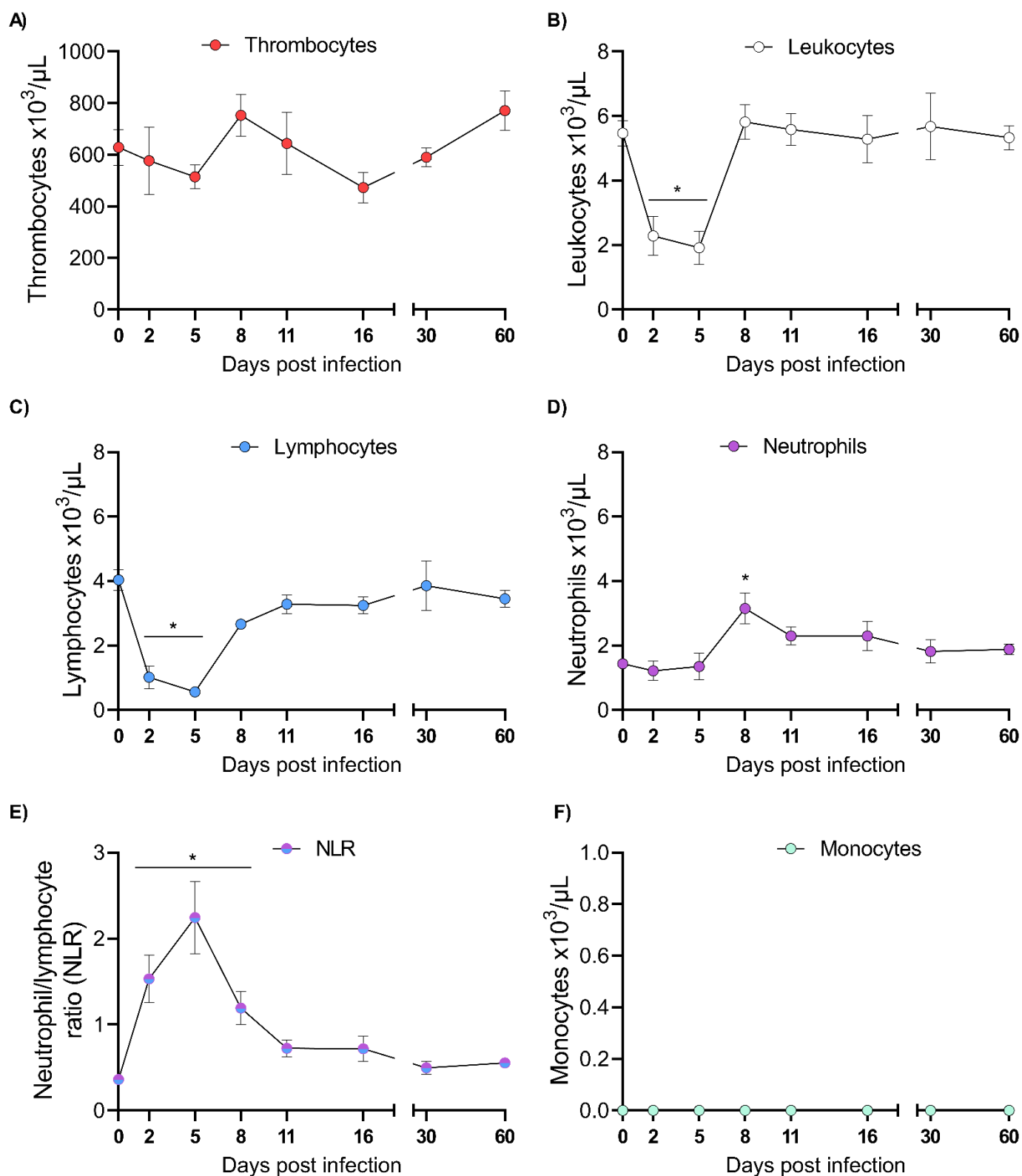


Figura 25. A infecção com MHV-A59 promove alterações hematológicas. Quantidade de plaquetas (A), leucócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) circulantes. (E) Razão entre neutrófilos por linfócitos circulantes. (F) Quantidade de monócitos. As análises foram realizadas pelo teste two-way ANOVA de medidas repetidas e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 5-6$.

4.14 Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste na lesão pulmonar da infecção com MHV-A59

Devido aos efeitos benéficos do tratamento terapêutico com roflumilaste na infecção com MHV-3 (**Figuras 4-7**), a qual representa um modelo murino de COVID-19 grave, decidimos avaliar os do roflumilaste na infecção com MHV-A59, um modelo murino que mimetizou aspectos da COVID-19 leve/moderada (**Figuras 20-25**). Para isso, adotamos uma estratégia terapêutica semelhante à estratégia que demonstrou eficácia no tratamento da lesão pulmonar induzida pela infecção com MHV-3, na qual o roflumilaste foi administrado 1 dia antes do pico da lesão pulmonar (**Figuras 3**). Portanto, os animais infectados com MHV-A59 foram tratados com 10 mg/kg de roflumilaste no 4º dia após a infecção e foram eutanasiados no 5º dia após a infecção para coleta de tecido pulmonar, sangue e lavado broncoalveolar (**Figura 26**).

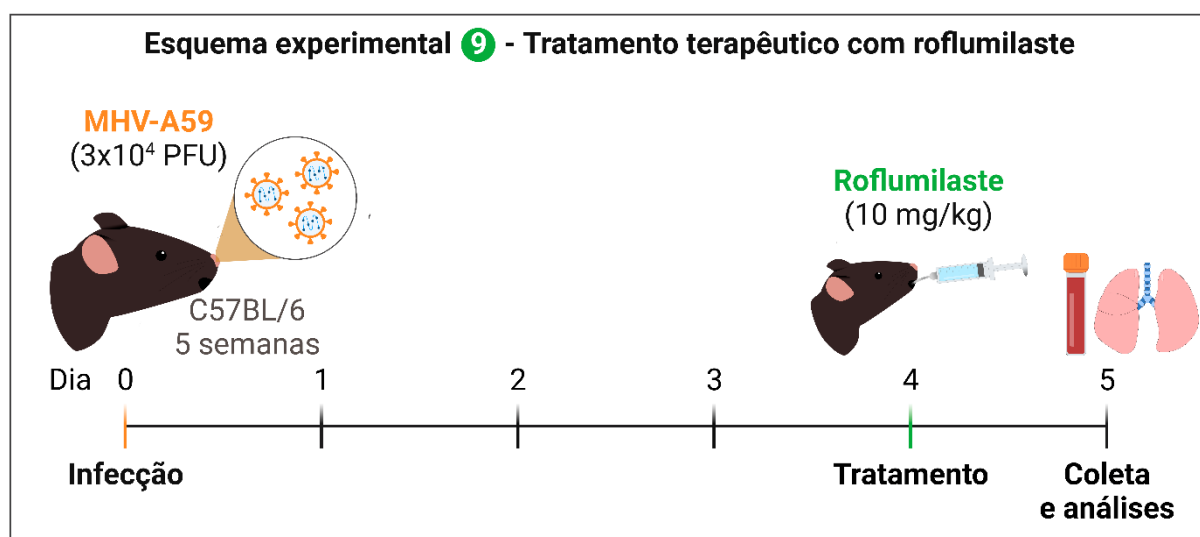


Figura 26. Esquema experimental 9: avaliação do tratamento terapêutico com roflumilaste nos parâmetros pulmonares e hematológicos da infecção com MHV-A59. Camundongos C57BL/6 de 5 semanas foram infectados com 3x10⁴ PFU de MHV-A59 e tratados ou não com roflumilaste (10 mg/kg; oral) no 4º dia após a infecção e eutanasiados no 5º dias após a infecção para coleta de tecido pulmonar, lavado broncoalveolar e sangue.

Quando comparados aos animais não infectados (**Figura 27A**), os animais infectados com MHV-A59 não tratados apresentaram escore inflamatório pulmonar leve a moderado, caracterizado pela presença infiltrado perivascular e peribronquiolar, descamação e apoptose de células bronquiolares e hemorragia (**Figura 27B**). Os animais infectados com MHV-A59 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste não tiveram redução no escore inflamatório pulmonar (**Figura 27C-D**), apesar da graduação de escore inflamatório estar reduzida em uma parcela dos animais tratados com roflumilaste (**Figura 27E**). Particularmente, este experimento apresentou uma alta

dispersão nos valores de escore inflamatório pulmonar no grupo de animais infectados com MHV-A59 não tratados, com desvio padrão de ($\pm 1,753$) (**Figura 27D**), e, inclusive, um dos animais infectados com MHV-A59 não apresentou alterações inflamatórias no tecido pulmonar (**Figura 27E**). Portanto, a avaliação desta estratégia terapêutica com roflumilaste ainda precisa ser validada em um experimento em que haja maior homogeneidade dentro do mesmo grupo. Somado à análise histológica, avaliamos o acúmulo de quimiocinas no tecido pulmonar. O tratamento com roflumilaste reduziu os níveis CXCL1 e CCL2 no tecido pulmonar de animais infectados com MHV-A59 (**Figura 27F-G**).

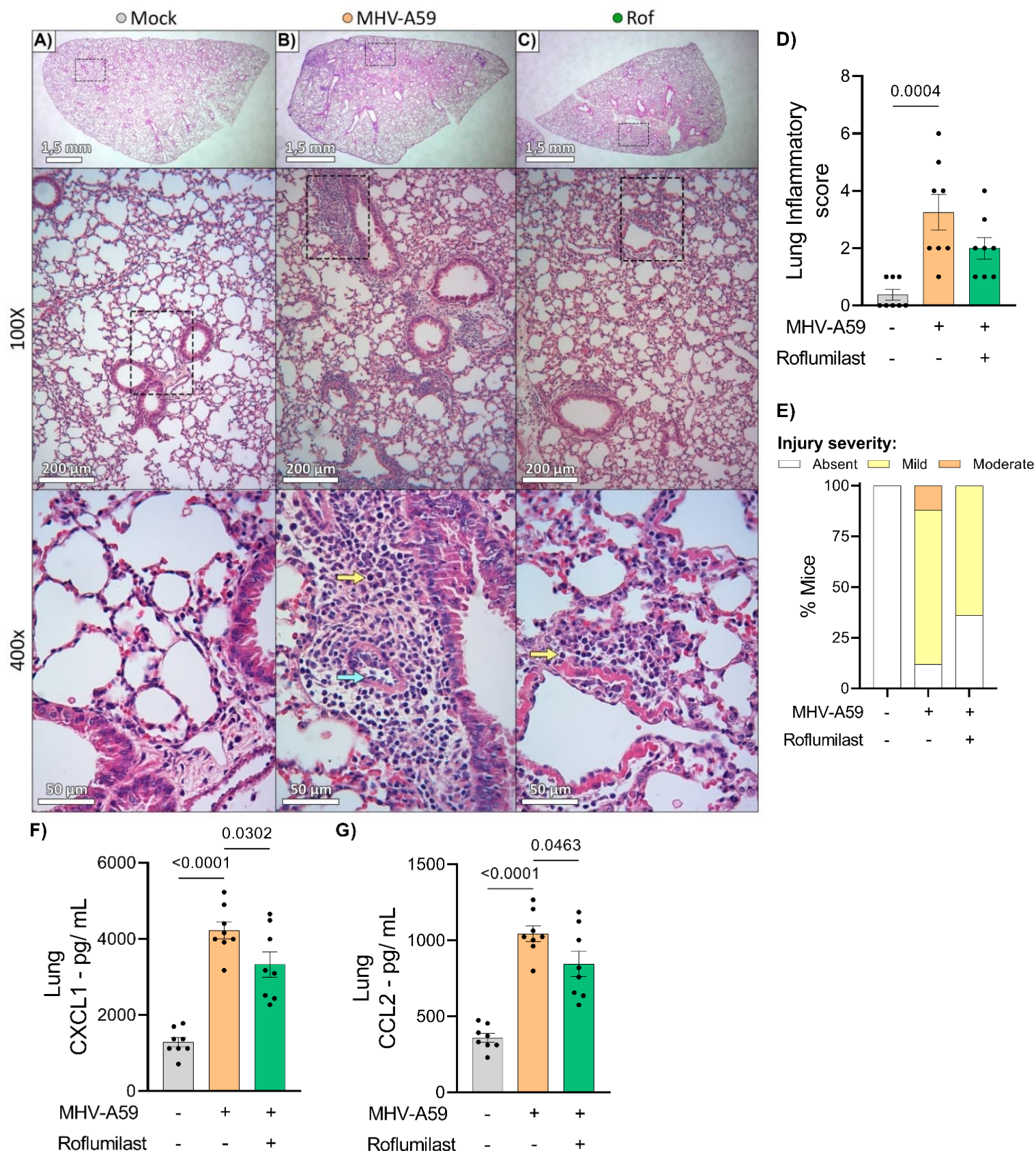


Figura 27. Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste na lesão pulmonar da infecção com MHV-A59. (A) Animais não infectados apresentaram aspecto saudável do tecido pulmonar. Animais infectados com MHV-A59 não tratados (B) e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste 4 dias após a infecção (C) apresentaram infiltrado perivascular e peribronquiolar, descamação e apoptose de células bronquiolares e hemorragia. (D) Análise semiquantitativa de escore inflamatório pulmonar. As análises foram realizadas pelo teste Kruskal-Wallis e pelos pós teste de Dunnett. (E) Porcentagem de animais de acordo com a graduação do escore inflamatório pulmonar. (F-G) Níveis de CXCL1 e CCL2 no tecido pulmonar. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 8$.

Além do tecido pulmonar, investigamos as alterações que a infecção com MHV-A59 induz no compartimento alveolar dos animais infectados. A infecção com MHV-A59 induziu um aumento no número de células no lavado broncoalveolar (**Figura 28A**), o que foi acompanhado por maiores níveis de proteínas totais (**Figura 28B**). De acordo com o maior acúmulo de células e proteína, os animais infectados com MHV-A59 tiveram aumento de CXCL1 e CCL2 no lavado broncoalveolar (**Figura 28C-D**). O tratamento com roflumilaste não alterou o número de células no lavado broncoalveolar de animais infectados com MHV-A59 (**Figura 28A**) e, em concordância, os níveis das quimiocinas CXCL1 e CCL2 não tiveram alteração com o tratamento (**Figura 28C-D**). Enquanto isso, o tratamento com roflumilaste reduziu os níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar em animais infectados com MHV-A59 (**Figura 28B**), o que pode estar relacionado com um menor dano tecidual pulmonar nestes animais. Neste sentido, apesar do quantitativo de células ser semelhante entre animais infectados com MHV-A59 e tratados ou não com roflumilaste, o perfil e a composição das células presentes no espaço alveolar destes animais podem ser distintos entre os dois grupos.

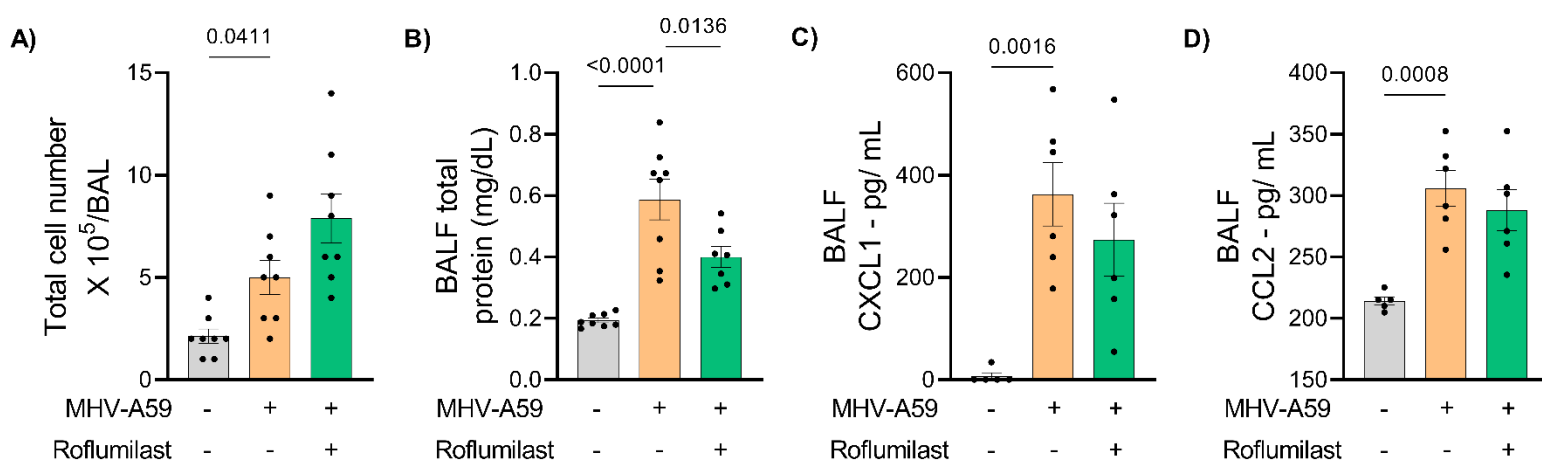


Figura 28. Efeito do tratamento terapêutico com roflumilaste no lavado broncoalveolar de animais infectados com MHV-A59. (A) Número total de células no lavado broncoalveolar. (B) Níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar. Níveis de CXCL1 (C) e CCL2 (D) no lavado broncoalveolar. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 8$.

Os animais infectados com MHV-A59 não apresentaram alteração na quantidade de plaquetas circulantes (**Figura 29A**). Enquanto isso, a infecção com MHV-A59 promoveu leucopenia (**Figura 29B**) decorrente da redução do número de linfócitos circulantes (**Figura 29C**) e não promoveu alteração do número de neutrófilos circulantes (**Figura 29D**). Consequentemente, houve aumento da NLR nos animais infectados com MHV-A59 (**Figura 29E**). Não houve alteração no número de monócitos (**Figura 29F**). Os animais infectados com MHV-A59 e tratados com roflumilaste

apresentaram alterações hematológicas semelhantes aos animais não tratados (Figura 29A-F).

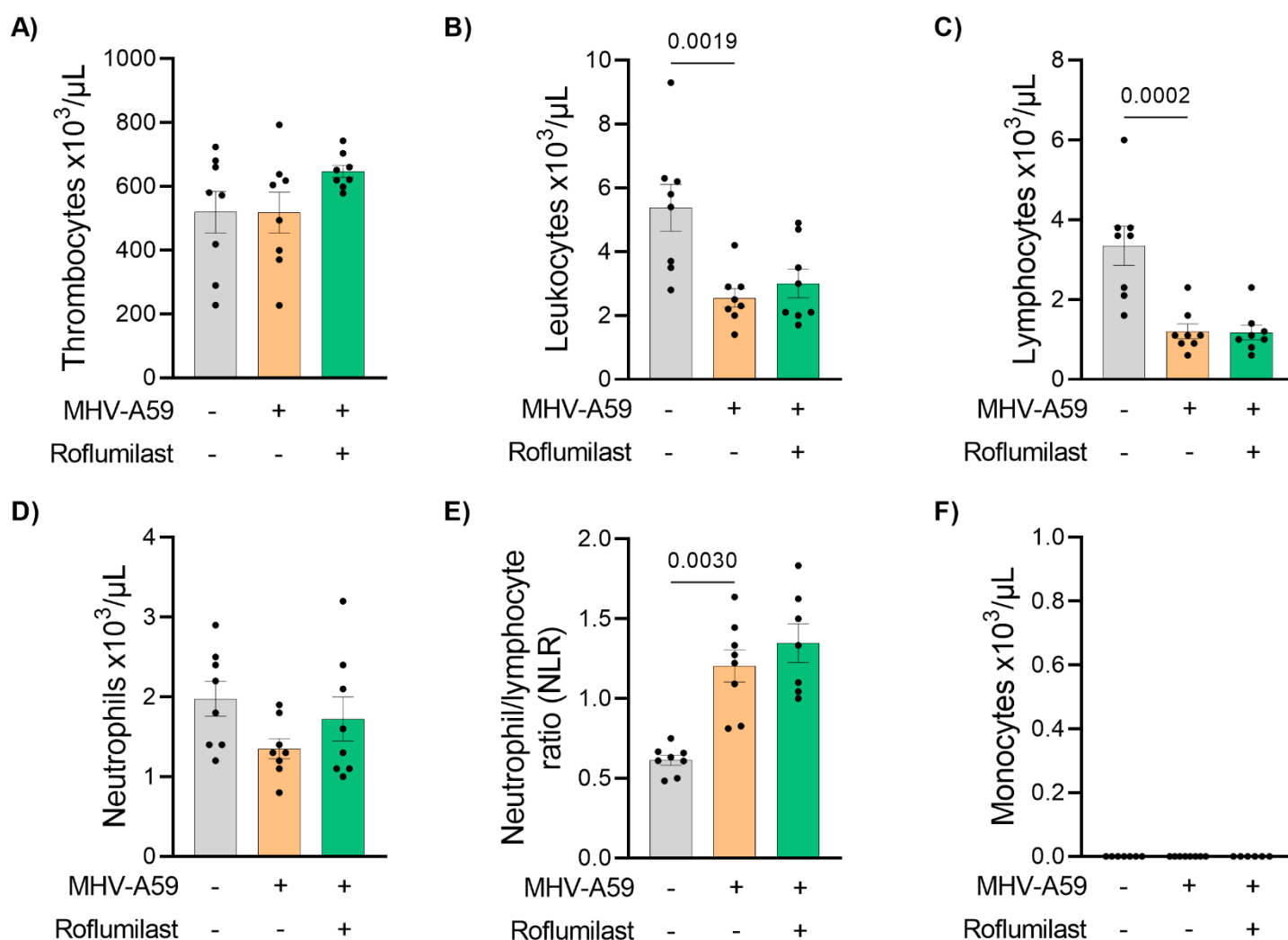


Figura 29. O tratamento terapêutico com roflumilaste não tem efeito nos parâmetros hematológicos associados à infecção com MHV-A59. Número de plaquetas (A), leucócitos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D) circulantes. (E) Razão entre neutrófilos por linfócitos. (F) Número de monócitos. As análises foram realizadas pelo teste one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$. $n = 8$

5. DISCUSSÃO

Camundongos infectados com MHV-3 ou MHV-A59, dois betacoronavirus murinos, desenvolvem alterações pulmonares histopatológicas e inflamatórias que mimetizam aspectos da doença pulmonar grave e leve, respectivamente, observada em pacientes com COVID-19. Aqui, nós demonstramos os efeitos dose e tempo dependente do tratamento com roflumilaste, um inibidor PDE4, na melhora de parâmetros inflamatórios pulmonares e sistêmicos associados à infecção com MHV-3. Investigamos também os efeitos aditivos ou sinérgicos do tratamento combinado com roflumilaste e dexametasona na melhora de parâmetros inflamatórios pulmonares associados à infecção com MHV-3. Demonstramos que a combinação de 1 mg/kg de roflumilaste e 0,1 mg/kg de dexametasona, dosagens que não possuem efeitos de melhora na inflamação pulmonar quando administradas isoladamente, promoveram redução da lesão pulmonar nos animais infectados com MHV-3. Por fim, caracterizamos o modelo de infecção intranasal com MHV-A59 e avaliamos os efeitos do tratamento com roflumilaste na lesão pulmonar induzida por sua infecção.

A infecção intranasal com MHV-3 promoveu uma lesão pulmonar aguda, caracterizada histologicamente pela presença de leucócitos em interação com células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares, infiltrado perivascular e infiltrado peribrônquico, presença células necróticas e hemorragia. Associado à essas alterações histológicas, demonstramos o aumento de mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, INF- γ , CXCL1 e CCL2 no pulmão dos animais infectados. Estes dados corroboram com o trabalho de caracterização do modelo previamente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (ANDRADE e colab., 2021), no qual a infecção com MHV-3 promoveu uma lesão aguda pulmonar transiente, com pico no 3º dia após a infecção, tempo o qual escolhemos para as análises neste trabalho. Aqui, nós demonstramos a presença de focos de infiltrado neutrofílico em regiões peribronquiolares e perivasculares de animais infectados com MHV-3 pela marcação com Ly6G, uma proteína específica de neutrófilos (LEE, Pui Y e colab., 2013). Em concordância, o trabalho de caracterização do modelo demonstrou a presença de células CD45⁺ em regiões circundantes à bronquíolos e vasos sanguíneos pulmonares (ANDRADE e colab., 2021), de modo que esta população de leucócitos descrita pode ser constituída, em parte, pelos focos de infiltrado neutrofílico demonstrados neste estudo. Além disso, os animais infectados com MHV-3 desenvolveram leucopenia e linfopenia,

alterações hematológicas observadas também em pacientes com COVID-19 e consideradas como marcador de gravidade da doença (GUAN e colab., 2020; HENRY e colab., 2020). Consequentemente, os animais infectados com MHV-3 tiveram aumento da NLR, outro parâmetro hematológico considerado como marcador de progressão e de fatalidade da COVID-19 (LIAO, Danying e colab., 2020; PONTI e colab., 2020).

Devido à emergência do SARS-CoV-2 e da COVID-19, diversos estudos têm investigado novas imunoterapias para o tratamento das infecções com coronavírus, como o tratamento com anti-inflamatórios esteroidais ou não-esteroidais, anticorpos neutralizantes, inibidores de citocinas e outros (VAN DE VEERDONK e colab., 2022). Aqui, nós demonstramos que a inibição de PDE4 utilizando seu inibidor seletivo, o roflumilaste, pode interferir no curso da doença causada pela infecção com coronavírus murino.

Animais infectados com MHV-3 e tratados com 10 mg/kg de roflumilaste no 2º dia após a infecção tiveram redução do escore inflamatório pulmonar e diminuição dos níveis de CXCL1 e CCL2 no pulmão, sem que houvesse alteração na carga viral pulmonar. Enquanto isso, o tratamento com 1 mg/kg não alterou o escore inflamatório e os níveis de quimiocinas pulmonares, o que sugere um efeito dose dependente do roflumilaste na diminuição da inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-3. Essa redução do escore inflamatório observada em animais tratados com 10 mg/kg de roflumilaste pode ser consequência da redução do acúmulo de neutrófilos e de macrófagos no tecido pulmonar. Apesar de não promover uma redução na quantificação de células Ly6G⁺ no pulmão de animais infectados com MHV-3, o tratamento com roflumilaste aboliu a presença dos focos de infiltrado neutrofílico perivasculares e peribronquiolares associados à infecção. Já foi demonstrado que os inibidores de PDE4, incluindo o roflumilaste, podem diminuir o acúmulo de polimorfonucleares no sítio inflamatório por diversos mecanismos. Neste sentido, um estudo em modelo de inflamação pulmonar desencadeada por LPS demonstrou que o tratamento com roflumilaste um menor acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar, o que foi associado à uma maior integridade da barreira epitelial pulmonar. *In vitro*, foi demonstrado que o tratamento de células epiteliais pulmonares com roflumilaste diminuiu a formação de fibras de estresse nestas células, um evento essencial para que ocorra a migração paracelular de neutrófilos (FILIPPI, 2019), e consequentemente

suprimiu a migração de neutrófilos em um ensaio de transmigração através de uma monocamada de células epiteliais pulmonares (KONRAD e colab., 2015). Além de promover a integridade da barreira epitelial pulmonar, a inibição da PDE4 pode suprimir a migração de neutrófilos pelos seus efeitos em células endoteliais. Nesse sentido, a depleção da isoforma PDE4B reduziu as interações de rolamento e de adesão entre neutrófilos e células endoteliais pela visualização em microscopia intravital na veia femoral de animais com isquemia e reperfusão da pata traseira. Esta menor interação entre neutrófilos e células endoteliais foi associada à redução da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais e pela diminuição dos níveis de CD11b em neutrófilos (WAN e colab., 2022), três molécula de adesão que participam da interação neutrófilo-endotélio (FILIPPI, 2019). Outro mecanismo de inibição da migração de neutrófilos promovido pelo aumento do AMPc é a redução da secreção de moléculas quimioatraentes. *In vitro*, foi observado que células epiteliais alveolares expostas à LPS tratadas com N-óxido roflumilaste e PGE2, uma prostaglandina indutora de AMPc, tiveram redução da secreção de CXCL1 e CXCL8, ambas quimiocinas que promovem a migração de neutrófilos (VICTONI e colab., 2014). Além disso, a incubação de neutrófilos com inibidores de PDE4 promove a supressão da secreção de CXCL8 por estas células (AU e colab., 1998; SCHIOPPA e colab., 2022). Portanto, a inibição da PDE4 pode atuar em células residentes do tecido e em leucócitos infiltrados para promover a diminuição da secreção de quimiocinas para neutrófilos. Por fim, o aumento dos níveis de AMPc intracelular pode modular a sobrevivência de neutrófilos. Neste sentido, foi demonstrado que a inibição da PDE4 com rolipram promoveu resolução da inflamação neutrofílica em modelo de pleurisia induzida por LPS, no qual houve indução da apoptose de neutrófilos pela inibição das vias de PKA-PI3K/Akt e NF- κ B (SOUSA e colab., 2010). Dessa forma, a redução do escore inflamatório pulmonar e a ausência de focos de infiltrado neutrofílico em regiões perivasculares e peribronquiolares no pulmão de animais infectados com MHV-3 e tratados no 2º dia após a infecção com 10 mg/kg roflumilaste pode estar relacionada com a redução dos níveis pulmonares de CXCL1, além dos possíveis efeitos de manutenção da integridade das barreiras epitelial, da redução de moléculas que participam da interação neutrófilo-endotélio e da indução da apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório.

Além da redução do acúmulo neutrófilos, a diminuição do infiltrado de macrófagos pode também ter contribuído para a melhora do escore inflamatório pulmonar observada nos animais tratados com roflumilaste. Embora o acúmulo de macrófagos não tenha sido quantificado, o tratamento com 10 mg/kg de roflumilaste administrado 2 dias após a infecção reduziu os níveis CCL2 no pulmão dos animais infectados com MHV-3. A CCL2 é uma quimiocina essencial para o processo de adesão e consequente extravasamento de monócitos, os quais, uma vez infiltrados no tecido periférico, diferenciam-se em macrófagos (KUZIEL e colab., 1997). Foi demonstrado que a administração dos inibidores de PDE4 roflumilaste e apremilast reduziu a secreção de CCL2 e foi associada à um menor acúmulo de macrófagos em modelos de nefropatia e de colite ulcerativa (COSTA e colab., 2023; LI e colab., 2019). Entretanto, ainda é necessário validar se a diminuição dos níveis CCL2 no pulmão dos animais infectados com MHV-3 e tratados roflumilaste está associada à uma diminuição do acúmulo de macrófagos. Vale ressaltar que além de afetar o acúmulo, o aumento dos níveis de AMPc também está relacionado com a polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório, o que poderia evitar um dano pulmonar exacerbado. Neste sentido, o tratamento com db-cAMP em modelo de pleurisia induzida por LPS promoveu a reprogramação de macrófagos para um perfil M2, com aumento dos níveis de anexina A1, um mediador pró-resolutivo, e aumento da capacidade eferocítica destes macrófagos (NEGREIROS-LIMA e colab., 2020). Além disso, em um modelo de encefalite autoimune experimental a administração de forskolina, um ativador da AC, também induziu marcadores de macrófagos M2, como Arg1, Mrc1, Fizz1 e Ym1, além de diminuir o marcador M1 iNOS (T e colab., 2018). Dessa forma, além do acúmulo, o perfil dos macrófagos infiltrados no pulmão de animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste pode estar alterado e deve ser investigado.

Nós demonstramos que o tratamento com roflumilaste na dose de 10 mg/kg, a qual melhorou a inflamação pulmonar dos camundongos infectados com MHV-3, também promoveu a recuperação das alterações hematológicas nestes animais, com reversão do quadro de linfopenia e redução da NLR, dois marcadores de progressão e fatalidade da COVID-19 (HENRY e colab., 2020; PONTI e colab., 2020). Além disso, os animais tratados com 10 mg/kg de roflumilaste apresentaram aumento do número de neutrófilos circulantes. Isso pode estar relacionado com uma supressão da

migração destas células à sítios inflamatórios periféricos, visto que a inibição de PDE4 atua diretamente nos neutrófilos, nas células epiteliais pulmonares e nas células endoteliais, de modo a inibir a interação neutrófilo-endotélio e suprimir a migração transendotelial e transepitelial (DUNNE e colab., 2019; KONRAD e colab., 2015; WAN e colab., 2022). Enquanto isso, o tratamento com 1 mg/kg de roflumilaste não reverteu as alterações hematológicas associadas à infecção com MHV-3, demonstrando um efeito dose dependente do roflumilaste.

Apesar da melhora nos parâmetros pulmonares e hematológicos nos camundongos infectados com MHV-3, o tratamento terapêutico com roflumilaste na dose de 10 mg/kg não resultou na diminuição da mortalidade nestes animais. Isso pode ser explicado pelo organotropismo do MHV-3 e pela cinética da doença associada à sua infecção. De fato, a infecção intranasal com MHV-3 induz pneumonia aguda nos camundongos infectados, a qual tem seu pico no 3º dia, tempo o qual fizemos as análises pulmonares e hematológicas. Entretanto, esse estado é transiente e a lesão e o infiltrado pulmonar decrescem no 5º dia após a infecção, o que sugere uma melhora natural do tecido pulmonar. Concomitantemente, o 5º dia após a infecção é marcado por vasta lesão hepática e por uma infecção generalizada, o que leva o animal à óbito (ANDRADE e colab., 2021). Portanto, a melhora dos parâmetros pulmonares e hematológicos no 3º dia após a infecção não refletem em um melhor desfecho da doença neste modelo.

Neste estudo observamos os efeitos dose dependente do roflumilaste na melhora da doença associada à infecção com MHV-3. Isto é confirmado pelos dados da literatura, que demonstram que a dose terapêutica do roflumilaste possui um intervalo de 1 à 10 mg/kg, com efeitos parciais na dose de 1 mg/kg e efeitos mais pronunciados nas doses de 5 à 10 mg/kg em modelos de lesão pulmonar induzida por bleomicina, de enfisema induzido por fumaça de cigarro e de artrite induzida por colágeno (BARSIG e colab., 2001; CORTIJO e colab., 2009; MARTORANA e colab., 2005). Nosso próximo passo foi estudar se diferentes posologias do roflumilaste, neste caso, número de doses, promoveria um melhor desfecho da doença associada à infecção com MHV-3. Entretanto, nós observamos que a antecipação do tratamento com roflumilaste reduziu sua eficácia. Animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste no 1º e no 2º dias após a infecção apresentaram escore inflamatório pulmonar semelhante aos animais infectados não tratados. Apesar de reduzir os

níveis pulmonares de CCL2, o tratamento antecipado com roflumilaste não diminuiu os níveis de CXCL1 e, dessa forma, a migração de neutrófilos pode ter permanecido inalterada frente ao tratamento. Atualmente, o roflumilaste, o apremilast e o crisaborole, três inibidores seletivos de PDE4, são aprovados para o uso humano no tratamento de DPOC, psoríase e dermatite atópica, respectivamente. Em um cenário pandêmico, como o vivenciado com a emergência do SARS-CoV-2 em 2019, os pacientes que já utilizam estes inibidores seletivos de PDE4 regularmente para o tratamento regular de suas doenças são recomendados a permanecerem em seu regime terapêutico. Em vista deste contexto, também avaliamos quais seriam os efeitos de uma estratégia de tratamento profilático com o roflumilaste no modelo murino de infecção com MHV-3. Esta estratégia, no entanto, causou o aumento do escore inflamatório pulmonar dos animais tratados. Ambos os eventos de perda de eficácia pela antecipação do tratamento terapêutico e de piora da lesão pulmonar dos animais tratados profilaticamente com roflumilaste podem estar associados à supressão parcial da resposta inflamatória em um momento inicial, crítico para contenção da replicação do MHV-3, o que resultou em uma posterior inflamação exacerbada ou prolongada. A infecção e a replicação viral promovem danos teciduais diretos ao hospedeiro, os quais iniciam um processo inflamatório. Essa resposta inflamatória inicial é importante para a ativação dos leucócitos residentes e para o recrutamento de leucócitos circulantes, pois eles são responsáveis pelo *clearance* viral. Portanto, a precoce inibição da resposta inflamatória pode suprimir a montagem de uma resposta antiviral e, com isso, propiciar um ambiente favorável à replicação viral e promover a exacerbação do dano tecidual mediado pelo vírus. Este balanço temporal entre a permissão de uma resposta inflamatória inicial e suficiente para contenção da replicação viral e a supressão de uma resposta inflamatória atrasada e exacerbada é observado em pacientes com COVID-19 tratados com dexametasona (FELDMAN e WATERER, 2022). Neste sentido, um estudo demonstrou que o tratamento com dexametasona em pacientes com COVID-19 que não estão em tratamento de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação causou um aumento da probabilidade de morte (CROTHERS e colab., 2022). Enquanto isso, a administração de dexametasona para o tratamento de pacientes com COVID-19 grave em regime de ventilação mecânica invasiva ou de oxigenação reduziu a incidência de mortalidade destes pacientes (P e colab., 2021). Portanto, a carga viral pulmonar é um fator que ainda necessita ser investigado nos animais infectados com MHV-3 e

tratados com roflumilaste na estratégia profilática e terapêutica antecipada, pois a precoce inibição da PDE4 pode estar associada à uma maior replicação viral no pulmão destes animais. Contrário à esta hipótese, um estudo em modelo de infecção pulmonar com influenza A demonstrou que o tratamento com rolipram, profilático ou terapêutico, não promoveu uma maior carga viral pulmonar nos animais tratados (SHARMA e colab., 2013). Entretanto, é necessário avaliar se a inibição de PDE4 possui este mesmo efeito em um contexto de infecção com coronavírus, os quais despertam uma resposta inflamatória distinta do vírus influenza.

Devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, o uso de dexametasona é um dos tratamentos recomendados pela OMS para pacientes com COVID-19 grave (LAMONTAGNE e colab., 2022). Entretanto, o uso de glicocorticoides possui efeitos adversos, como o maior risco de infecções oportunistas e o desenvolvimento de hiperglicemia, ambos relatados em pacientes com COVID-19 (ABDOLI e colab., 2022; BROOKS e colab., 2022). Em vista deste cenário, estratégias que reduzam o uso de glicocorticoides e que concomitantemente mantenham sua eficácia tornam-se importantes. Um método para tal é a combinação de drogas ou compostos com efeitos sinérgicos ou aditivos, de modo a amplificar os efeitos terapêuticos e diminuir a dosagem utilizada. Aqui, nós demonstramos que dosagens de roflumilaste e de dexametasona que não possuem efeitos terapêuticos quando administradas isoladamente quando associadas resultam na melhora do escore inflamatório pulmonar de animais infectados com MHV-3. Um dos mecanismos sugeridos para o sinergismo entre roflumilaste e a dexametasona é o de supressão do processo de tolerância à ambas as drogas. Neste sentido, em um modelo de infecção pulmonar com *Haemophilus influenzae*, a administração de roflumilaste resultou em uma retroalimentação negativa em que houve aumento da expressão e dos níveis de PDE4B nas células pulmonares do animais tratados. No entanto, a combinação de dexametasona ao tratamento com roflumilaste impediu o aumento dos níveis de PDE4B por um mecanismo dependente da ativação de GRs. Como resultado, o tratamento combinado de dexametasona e roflumilaste teve maior eficácia na redução dos níveis das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CCL5, e CCL7, na inibição da migração de neutrófilos para o tecido pulmonar e na redução do escore histopatológico quando comparado aos tratamentos isolados com roflumilaste ou dexametasona (LEE, Byung Cheol e colab., 2018). Por sua vez, um estudo em modelo de asma neutrofílica

demonstrou que o roflumilaste pode suprimir o processo de resistência à glicocorticoides pelo aumento dos níveis da histona deacetilase 2 (HDAC2) (PARK e colab., 2022). A HDAC2 é uma enzima que causa a deacetilação dos GRs, um processo necessário para que ocorra sua associação ao complexo do NF- κ B e consequente a supressão de genes pró-inflamatórios (K e colab., 2006). De acordo, estudos *in vitro* da combinação de inibidores de PDE4 e dexametasona demonstraram efeitos anti-inflamatórios aditivos em células epiteliais pulmonares, em linfócitos TCD8 e em células mononucleares do sangue periférico (GRUNDY e colab., 2016; MILARA e colab., 2015; TANNHEIMER e colab., 2012). Portanto, o roflumilaste e a dexametasona podem atuar amplificando as suas vias de sinalização direta e concomitantemente e, dessa forma, promover anti-inflamatório aditivo ou sinérgico para a melhora da inflamação pulmonar observada nos animais infectados com MHV-3.

A infecção com MHV-3, apesar de induzir uma resposta inflamatória pulmonar, promove uma infecção generalizada e um grave dano hepático nos animais infectados. Em vista disso, nós padronizamos a infecção intranasal com o MHV-A59, o qual possui um menor hepatotropismo e uma resposta inflamatória contida em maior grau ao tecido pulmonar para investigar as terapias propostas neste trabalho. Dessa forma, a infecção com MHV-A59 pode representar um modelo experimental mais adequado para se investigar melhor as terapias propostas neste trabalho. Animais infectados com MHV-A59 apresentam poucos sinais clínicos e perda de peso transiente. Além disso, a infecção com MHV-A59 foi letal aos camundongos com o inóculo utilizado, o que o torna um modelo exequível para o estudo de sequelas à longo prazo decorrentes da infecção com coronavírus. O modelo também mimetiza as alterações hematológicas transientes de leucopenia, linfopenia e aumento da NLR observadas em pacientes com COVID-19 (GUAN e colab., 2020; HENRY e colab., 2020). A infecção intranasal com o MHV-A59 se demonstrou aguda e autolimitada, de forma que o *clearance* viral pulmonar aconteceu naturalmente ao longo dos primeiros dias após a infecção. Com isso, terapias antivirais que visam acelerar o *clearance* e/ou impedir a replicação viral podem se valer deste modelo. Nossos achados demonstraram que infecção com MHV-A59 promoveu uma resposta inflamatória pulmonar caracterizada por infiltrado perivascular e peribrônquico, descamação e apoptose de células bronquiolares, leucócitos em processo de morte celular e pontos

de hemorragia. Esse processo inflamatório pulmonar foi leve e autolimitado, de modo que o modelo mimetiza aspectos da doença pulmonar de pacientes com COVID-19 leve.

Semelhante ao observado em animais infectados com MHV-3, o tratamento com roflumilaste demonstrou efeito tempo dependente na inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-A59. Embora não estatisticamente significativo, o tratamento terapêutico com roflumilaste reduziu parcialmente o escore inflamatório pulmonar dos animais infectados com MHV-A59, enquanto a antecipação do tratamento causou a abolição deste efeito. Diferentemente do observado em animais infectados com MHV-3, o tratamento com roflumilaste não teve efeito nas alterações hematológicas associadas à infecção com MHV-A59

6. CONCLUSÃO

Aqui, nós demonstramos que o roflumilaste possui efeitos dose e tempo dependentes na melhora dos parâmetros inflamatórios pulmonares e hematológicos em um modelo murino de COVID-19 grave pela infecção com MHV-3 (**Figura 30**). Ademais, a combinação de roflumilaste e dexametasona em baixas dosagens tiveram efeito anti-inflamatório sinérgico ou aditivo na melhora da inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-3. Dessa forma, evidenciamos novas oportunidades de intervenções terapêuticas para o tratamento de infecções por coronavírus e propomos estratégias que mitiguem efeitos os adversos. Por fim, caracterizamos um modelo murino de COVID-19 leve/moderada com a recuperação localizada de títulos virais e lesão pulmonar autolimitada pela infecção intranasal com MHV-A59.

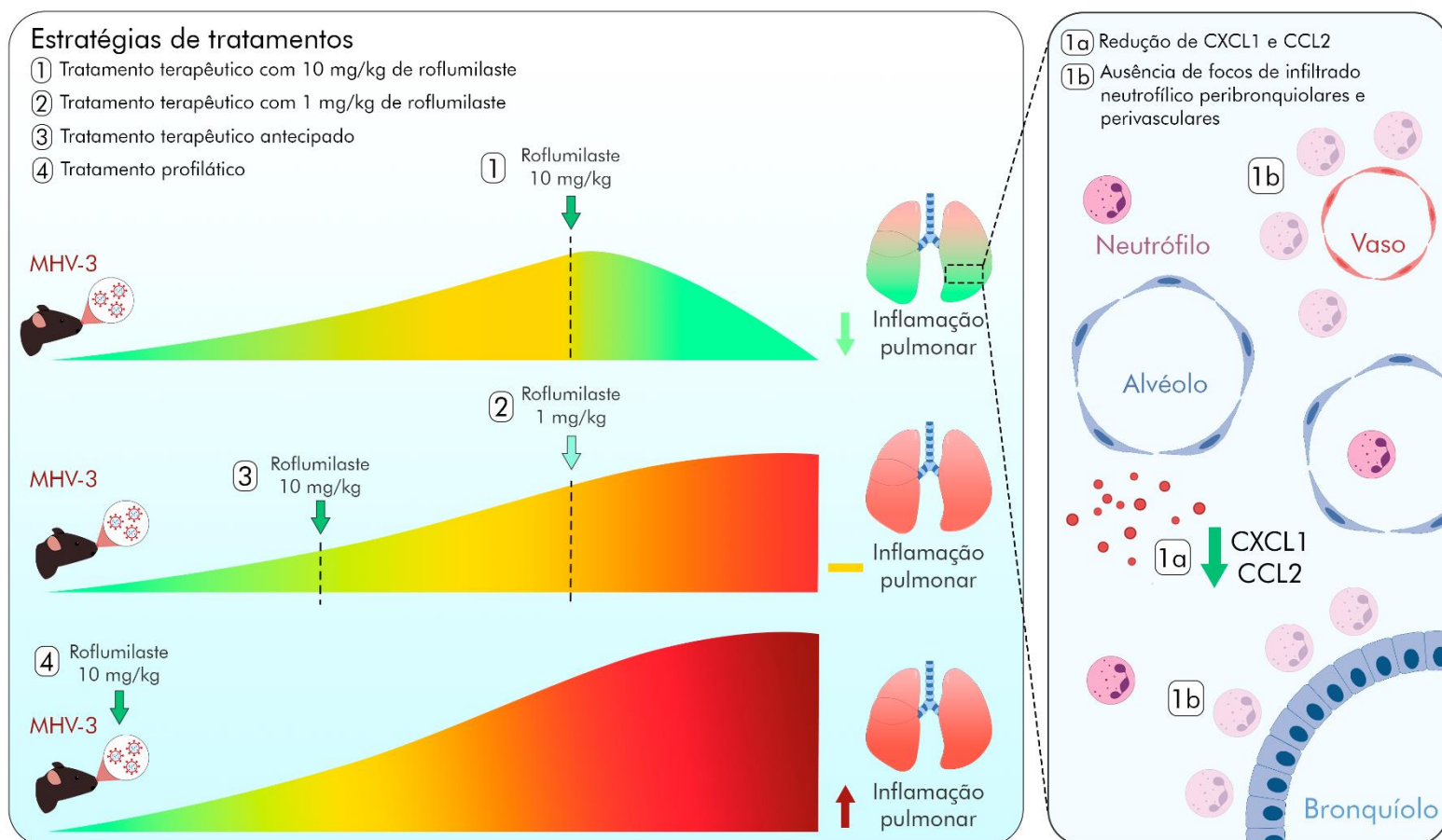


Figura 30. Efeitos dose e tempo dependentes do roflumilaste na melhora da inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-3. Neste estudo avaliamos os efeitos do roflumilaste na melhora da inflamação pulmonar associada à infecção com MHV-3 em quatro distintas estratégias: **(1)** tratamento terapêutico com 10 mg/kg de roflumilaste, **(2)** tratamento terapêutico com 1 mg/kg de roflumilaste, **(3)** tratamento terapêutico antecipado e **(4)** tratamento profilático. **(1)** O tratamento terapêutico com 10 mg/kg de roflumilaste reduziu o escore inflamatório dos animais infectados com MHV-3, o que foi associado com diminuição dos níveis pulmonares de CXCL1 e CCL2 **(1a)** e com a abolição de focos neutrofílicos em regiões perivascularares e peribronquiolares **(1b)**. Os tratamentos terapêuticos com 1 mg/kg de roflumilaste **(2)** e terapêutico antecipado **(3)** não tiveram efeito no escore inflamatório pulmonar dos animais infectados. **(4)** O tratamento profilático com roflumilaste causou um aumento no escore inflamatório pulmonar dos animais infectados com MHV-3.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste estudo, almejamos avaliar os efeitos do roflumilaste no modelo murino de infecção com SARS-CoV-2 em camundongos transgênicos para a proteína ECA2 humana direcionada ao gene promotor de citoqueratina 18, de modo a adquirir um caráter translacional. Além disso, investigaremos a carga viral no pulmão dos animais infectados com MHV-3 e tratados com roflumilaste nas estratégias terapêutica antecipada e profilática para esclarecer os efeitos da inibição da PDE4 no *clearance* viral em infecção por coronavírus. Além disso, pretendemos aprofundar o entendimento do mecanismo do tratamento combinado de roflumilaste e dexametasona em vias de sinalização inflamatórias e de sobrevivência de leucócitos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A, Kavanaugh e colab. **Longterm (52-week) results of a phase III randomized, controlled trial of apremilast in patients with psoriatic arthritis.** The Journal of rheumatology, v. 42, n. 3, p. 479–488, 1 Mar 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25593233/>>. Acesso em: 8 ago 2021.

A, Kavanaugh e colab. **Treatment of psoriatic arthritis in a phase 3 randomised, placebo-controlled trial with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor.** Annals of the rheumatic diseases, v. 73, n. 6, p. 1020–1026, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24595547/>>. Acesso em: 8 ago 2021.

ABANI, Obbina e colab. **Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial.** The Lancet, v. 397, n. 10285, p. 1637–1645, 1 Maio 2021. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673621006760/fulltext>>. Acesso em: 30 abr 2023.

ABDOLI, Amir e FALAHI, Shahab e KENARKOOHI, Azra. **COVID-19-associated opportunistic infections: a snapshot on the current reports.** Clinical and Experimental Medicine, v. 22, n. 3, p. 327, 1 Ago 2022. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8381864/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35481864/)>. Acesso em: 25 abr 2023.

ABRAHAM, Sushma e colab. **Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site.** Virology, v. 176, n. 1, p. 296–301, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2184576/>>. Acesso em: 15 mar 2023.

ACKERMANN, Maximilian e colab. **Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19.** New England Journal of Medicine, v. 383, n. 2, p. 120–128, 9 Jul 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2015432>>. Acesso em: 26 mar 2023.

ADACHI, Tetsuya e colab. **Eosinophil apoptosis caused by theophylline, glucocorticoids, and macrolides after stimulation with IL-5.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 98, n. 6, p. S207–S215, 1 Dez 1996. Acesso em: 1 maio 2023.

AHN, Ji Hoon e colab. **Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19.** The Journal of Clinical Investigation, v. 131, n. 13, 7 Jul 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8245175/>. Acesso em: 11 abr 2023.

ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira e colab. **A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations.** Journal of Virology, v. 95, n. 22, p. 1276–1297, 27 Out 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01276-21>. Acesso em: 2 mar 2023.

ANNANE, Djillali. **The Role of ACTH and Corticosteroids for Sepsis and Septic Shock: An Update.** Frontiers in endocrinology, v. 7, 20 Jun 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27379022/>. Acesso em: 18 abr 2023.

ARIEL, Amiram e SERHAN, Charles N. **New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation.** Frontiers in Immunology, v. 3, n. JAN, 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3342362/>. Acesso em: 7 ago 2021.

ARLAUCKAS, Sean P. e colab. **Arg1 expression defines immunosuppressive subsets of tumor-associated macrophages.** Theranostics, v. 8, n. 21, p. 5842–5854, 2018.

ARONOFF, David M. e colab. **Short communication: differences between macrophages and dendritic cells in the cyclic AMP-dependent regulation of lipopolysaccharide-induced cytokine and chemokine synthesis.** Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, v. 26, n. 11, p. 827–833, Nov 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17115901/>. Acesso em: 30 abr 2023.

ARPAN SHARMA NEUPANE, Authors e colab. **Patrolling Alveolar Macrophages Conceal Bacteria from the Immune System to Maintain Homeostasis.** 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.020>. Acesso em: 14 abr 2023.

ASIF, Sana e colab. **Immuno-Modulatory Effects of Dexamethasone in Severe COVID-19-A Swedish Cohort Study.** Biomedicines, v. 11, n. 1, 1 Jan 2023.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672672/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

ASTAPENKO, David e colab. **Endothelial glycocalyx damage in patients with severe COVID-19 on mechanical ventilation – A prospective observational pilot study**. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 81, n. 3, p. 205–219, 1 Jan 2022. Acesso em: 17 abr 2023.

ATSUTA, Jun e colab. **Inhibition of VCAM-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids**. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 20, n. 4, p. 643–650, 1999. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10100995/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

AU, B. T. e colab. **Effect of PDE4 inhibitors on zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils: synergism with prostanoids and salbutamol**. *British Journal of Pharmacology*, v. 123, n. 6, p. 1260–1266, 1 Mar 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0701723>>. Acesso em: 6 maio 2023.

B, Rockx e colab. **Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model**. *Science (New York, N.Y.)*, v. 368, n. 6494, p. 1012–1015, 29 Maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32303590/>>. Acesso em: 7 ago 2021.

BARANOV, Pavel V. e colab. **Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome**. *Virology*, v. 332, n. 2, p. 498–510, 20 Fev 2005. Acesso em: 18 mar 2023.

BARNES, Betsy J. e colab. **Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps**. *Journal of Experimental Medicine*, v. 217, n. 6, 1 Jun 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20200652>>. Acesso em: 29 abr 2023.

BARSIG, J e colab. **FRI0018 Protection by phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast of mice against collagen-induced arthritis**. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 60, n. Suppl 1, p. A452–A452, 1 Jun 2001. Disponível em: <https://ard.bmj.com/content/60/Suppl_1/A452.2>. Acesso em: 6 maio 2023.

BARTHOLD, S. W. e SMITH, Abigail L. **Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice**. Archives of virology, v. 81, n. 1–2, p. 103–112, Mar 1984. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6331343/>>. Acesso em: 15 abr 2023.

BASTARD, Paul e colab. **Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths**. Science Immunology, v. 6, n. 62, p. 4340–4359, 19 Ago 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.abl4340>>. Acesso em: 15 abr 2023.

BEAULIEU, Elaine e MORAND, Eric F. **Role of GILZ in immune regulation, glucocorticoid actions and rheumatoid arthritis**. Nature Reviews Rheumatology 2011 7:6, v. 7, n. 6, p. 340–348, 10 Maio 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrrheum.2011.59>>. Acesso em: 18 abr 2023.

BERGSBAKEN, Tessa e FINK, Susan L. e COOKSON, Brad T. **Pyroptosis: host cell death and inflammation**. Nature reviews. Microbiology, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19148178/>>. Acesso em: 15 maio 2023.

BLANCO-MELO, Daniel e colab. **Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19**. Cell, v. 181, n. 5, p. 1036–1045.e9, 28 Maio 2020. Acesso em: 15 abr 2023.

BLANK, Christian U. e colab. **Defining ‘T cell exhaustion’**. Nature Reviews Immunology, v. 19, n. 11, p. 665–674, 1 Nov 2019. Acesso em: 17 abr 2023.

BOEHNCKE, Wolf-Henning e SCHÖN, Michael P. **Psoriasis**. The Lancet, v. 386, n. 9997, p. 983–994, 5 Set 2015. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673614619097/fulltext>>. Acesso em: 8 ago 2021.

BONAVENTURA, Aldo e colab. **Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19**. Nature reviews. Immunology, v. 21, n. 5, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33824483/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

BOSCARINO, Joseph A. e colab. **Envelope Protein Palmitoylations Are Crucial for Murine Coronavirus Assembly**. Journal of Virology, v. 82, n. 6, p. 2989–2999, 15 Mar 2008. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01906-07>>. Acesso em: 20 mar 2023.

BOSCH, Berend Jan e colab. **The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex**. Journal of Virology, v. 77, n. 16, p. 8801–8811, 15 Ago 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>>. Acesso em: 18 mar 2023.

BOSON, Bertrand e colab. **The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles**. The Journal of biological chemistry, v. 296, 1 Jan 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33229438/>>. Acesso em: 20 mar 2023.

BOUMPAS, D. T. e colab. **Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates**. Annals of internal medicine, v. 119, n. 12, p. 1198–1208, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8239251/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

BROOKS, Danielle e colab. **Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia Including Dexamethasone-Associated Hyperglycemia in COVID-19 Infection: A Systematic Review**. Endocrine Practice, v. 28, n. 11, p. 1166–1177, 1 Nov 2022. Acesso em: 25 abr 2023.

BRUDER, Dunja e SRIKIATKHACHORN, Anon e ENELOW, Richard I. **Cellular Immunity and Lung Injury in Respiratory Virus Infection**. <https://home.liebertpub.com/vim>, v. 19, n. 2, p. 147–155, 3 Jul 2006. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vim.2006.19.147>>. Acesso em: 16 maio 2023.

C, Paul e colab. **Efficacy and safety of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis over 52 weeks: a phase III, randomized controlled trial (ESTEEM 2)**. The

British journal of dermatology, v. 173, n. 6, p. 1387–1399, 1 Dez 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26357944/>>. Acesso em: 8 ago 2021.

CAIN, Derek W. e CIDLOWSKI, John A. **Immune regulation by glucocorticoids**. Nature Reviews Immunology 2017 17:4, v. 17, n. 4, p. 233–247, 13 Fev 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2017.1>>. Acesso em: 18 abr 2023.

CALVERLEY, Peter M.A. e colab. **Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 176, n. 2, p. 154–161, 15 Jul 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17463412/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

CALVERLEY, Peter MA e colab. **Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials**. The Lancet, v. 374, n. 9691, p. 685–694, 4 Set 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716960/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

CARDINAL-FERNANDEZ, Pablo e colab. **Acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage new insights on a complex relationship**. Annals of the American Thoracic Society, v. 14, n. 6, p. 844–850, 1 Jun 2017. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 12 abr 2023.

CARTHEW, P. e SPARROW, S. **Murine coronaviruses: the histopathology of disease induced by intranasal inoculation**. Research in Veterinary Science, v. 30, n. 3, p. 270, 1981. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7127176/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/67127176/)>. Acesso em: 16 abr 2023.

CASAI, Rosa e colab. **Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism**. Journal of virology, v. 77, n. 16, p. 9084–9089, 15 Ago 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12885925/>>. Acesso em: 5 abr 2023.

CHAN, Abigail Sy e ROUT, Amit. **Use of Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in COVID-19**. Journal of Clinical Medicine Research, v. 12, n. 7, p. 448, 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7331861/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/331861/)>. Acesso em: 2 mar 2023.

CHARMAINE, Foltz e MOLLIE, Ullman-Cullere. Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. [S.l: s.n.], 1999. .

CHEEVER, F. S. e DANIELS, J. B. **A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin.** The Journal of experimental medicine, v. 90, n. 3, p. 181–210, 1949. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18137294/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

CHIMOTE, Ameet A. e colab. **Immune and ionic mechanisms mediating the effect of dexamethasone in severe COVID-19.** Frontiers in immunology, v. 14, p. 1143350, 24 Mar 2023. Acesso em: 17 abr 2023.

CHROUSOS, George P. **Stress and disorders of the stress system.** Nature reviews. Endocrinology, v. 5, n. 7, p. 374–381, Jul 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19488073/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

CHROUSOS, George P. **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.** The New England journal of medicine, v. 332, n. 20, p. 1351–1363, 18 Maio 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7715646/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

COLLINS, Arlene R. e colab. **Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell--cell fusion.** Virology, v. 119, n. 2, p. 358–371, 1982. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6281979/>>. Acesso em: 15 mar 2023.

CONTI, Marco e BEAVO, Joseph. **Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling.** Annual Review of Biochemistry. [S.l.]: Annu Rev Biochem. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17376027/>>. Acesso em: 13 jun 2021. , 2007

CORTIJO, J. e colab. **Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury.** British Journal of Pharmacology, v. 156, n. 3, p. 534–544, 1 Fev 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2008.00041.x>>. Acesso em: 6 maio 2023.

COSTA, Walyson Coelho e colab. **Therapeutic treatment with phosphodiesterase-4 inhibitors alleviates kidney injury and renal fibrosis by increasing MMP-9 in a doxorubicin-induced nephrotoxicity mouse model.** *International Immunopharmacology*, v. 115, p. 109583, 1 Fev 2023. Acesso em: 23 abr 2023.

CP, Page e D, Spina. **Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases.** *Handbook of experimental pharmacology*, v. 204, n. 204, p. 391–414, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21695650/>>. Acesso em: 8 ago 2021.

CRONSTEIN, B. N. e colab. **A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 21, p. 9991–9995, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1279685/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

CROTHERS, Kristina e colab. **Dexamethasone in hospitalised COVID-19 patients not on intensive respiratory support.** *European Respiratory Journal*, v. 60, n. 1, 1 Jul 2022. Disponível em: <<https://erj.ersjournals.com/content/60/1/2102532>>. Acesso em: 25 abr 2023.

DALAMAGA, Maria e KARAMPELA, Irene e MANTZOROS, Christos S. **Commentary: Phosphodiesterase 4 inhibitors as potential adjunct treatment targeting the cytokine storm in COVID-19.** *Metabolism: clinical and experimental*, v. 109, 1 Ago 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32497535/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

DE ALBUQUERQUE, Nadine e colab. **Murine hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice.** *Journal of virology*, v. 80, n. 21, p. 10382–10394, Nov 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17041219/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

DE GROOT, R. J. e colab. **Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses.** *Journal of molecular biology*, v. 196, n. 4, p. 963–966, 20

Ago 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3681988/>>. Acesso em: 18 mar 2023.

DELOREY, Toni M. e colab. **COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets**. Nature 2021 595:7865, v. 595, n. 7865, p. 107–113, 29 Abr 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-021-03570-8>>. Acesso em: 14 abr 2023.

DINNON, Kenneth H. e colab. **A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures**. Nature 2020 586:7830, v. 586, n. 7830, p. 560–566, 27 Ago 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2708-8>>. Acesso em: 8 ago 2021.

DP, Vasconcelos e colab. **Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators**. Biomaterials, v. 37, p. 116–123, 1 Jan 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25453942/>>. Acesso em: 7 ago 2021.

DS, Postma e HA, Kerstjens. **Characteristics of airway hyperresponsiveness in asthma and chronic obstructive pulmonary disease**. American journal of respiratory and critical care medicine, v. 158, n. 5 Pt 3, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9817744/>>. Acesso em: 10 ago 2021.

DUNNE, Amy E. e colab. **Direct Inhibitory Effect of the PDE4 Inhibitor Roflumilast on Neutrophil Migration in Chronic Obstructive Pulmonary Disease**. American journal of respiratory cell and molecular biology, v. 60, n. 4, p. 445–453, 1 Abr 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30395484/>>. Acesso em: 19 abr 2023.

ECKERT, D. M. e KIM, P. S. **Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition**. Annual review of biochemistry, v. 70, p. 777–810, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11395423/>>. Acesso em: 18 mar 2023.

EHAIDEB, Salleh N. e colab. **Evidence of a wide gap between COVID-19 in humans and animal models: a systematic review**. Critical Care 2020 24:1, v. 24, n. 1, p. 1–23, 6 Out 2020. Disponível em:

<<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-020-03304-8>>. Acesso em: 8 ago 2021.

EHRCHEN, Jan e colab. **Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes**. *Blood*, v. 109, n. 3, p. 1265–1274, 1 Fev 2007. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/109/3/1265/23908/Glucocorticoids-induce-differentiation-of-a>>. Acesso em: 18 abr 2023.

ELENKOV, Ilia J. **Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1024, p. 138–146, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15265778/>>. Acesso em: 19 abr 2023.

ENGELMANN, Bernd e MASSBERG, Steffen. **Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity**. *Nature reviews. Immunology*, v. 13, n. 1, p. 34–45, Jan 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23222502/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

FALCINELLI, Emanuela e colab. **Role of endothelial dysfunction in the thrombotic complications of COVID-19 patients**. *Journal of Infection*, v. 82, n. 5, p. 186–230, 1 Maio 2021. Disponível em: <<http://www.journalofinfection.com/article/S016344532030760X/fulltext>>. Acesso em: 26 mar 2023.

FANAROFF, Alexander C. e LOPES, Renato D. **COVID-19 Thrombotic Complications and Therapeutic Strategies**. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-110257>, v. 74, n. 1, p. 15–30, 27 Jan 2023. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-042921-110257>>. Acesso em: 26 mar 2023.

FELDMAN, Charles e WATERER, Grant. **When should corticosteroids be used for COVID-19 infection?** *European Respiratory Journal*, v. 60, n. 1, 1 Jul 2022. Disponível em: <<https://erj.ersjournals.com/content/60/1/2103222>>. Acesso em: 25 abr 2023.

FILES, D. Clark e colab. **Report of the first seven agents in the I-SPY COVID trial: a phase 2, open label, adaptive platform randomised controlled trial**. *eClinicalMedicine*, v. 58, 1 Abr 2023. Disponível em:

<<http://www.thelancet.com/article/S2589537023000664/fulltext>>. Acesso em: 17 abr 2023.

FILIPPI, Marie Dominique. **Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives**. Blood, v. 133, n. 20, p. 2149, 5 Maio 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6524565/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)>. Acesso em: 6 maio 2023.

FORNI, Diego e colab. **Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes**. Trends in microbiology, v. 25, n. 1, p. 35–48, 1 Jan 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27743750/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

FOSMIRE, J A e HWANG, K e MAKINO, S. **Identification and characterization of a coronavirus packaging signal**. Journal of virology, v. 66, n. 6, p. 3522–3530, Jun 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1316465/>>. Acesso em: 20 mar 2023.

FRASCH, S. Courtney e colab. **Signaling via Macrophage G2A Enhances Efferocytosis of Dying Neutrophils by Augmentation of Rac Activity**. The Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 14, p. 12108, 8 Abr 2011. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3069415/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/)>. Acesso em: 7 ago 2021.

FUCHS, Tobias A. e colab. **Extracellular DNA traps promote thrombosis**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 36, p. 15880–15885, 7 Set 2010. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1005743107>>. Acesso em: 26 mar 2023.

FURIE, Bruce e FURIE, Barbara C. **The Molecular Basis of Blood Coagulation Review**. Cell. [S.l: s.n.], 1988. . Acesso em: 18 jun 2021.

GALANI, Ioanna E e ANDREAKOS, Evangelos. **Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats**. Journal of Leukocyte Biology, v. 98, n. 4, p. 557–564, 1 Out 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/98/4/557/6935912>>. Acesso em: 14 abr 2023.

GALLI, M e colab. **Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study**. The Lancet Infectious Diseases, v. 20, p. 1135–1140, 2020. Disponível em: <www.thelancet.com/infection>. Acesso em: 9 maio 2021.

GALON, Jérôme e colab. **Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells**. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 16, n. 1, p. 61–71, Jan 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11772937/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

GAUVREAU, Gail M e colab. **Roflumilast attenuates allergen-induced inflammation in mild asthmatic subjects**. *Respiratory Research* 2011 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–10, 1 Dez 2011. Disponível em: <<https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-12-140>>. Acesso em: 10 ago 2021.

GILES, Katherine M. e colab. **Glucocorticoid Augmentation of Macrophage Capacity for Phagocytosis of Apoptotic Cells Is Associated with Reduced p130Cas Expression, Loss of Paxillin/pyk2 Phosphorylation, and High Levels of Active Rac**. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 2, p. 976–986, 15 Jul 2001. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/167/2/976/33964/Glucocorticoid-Augmentation-of-Macrophage-Capacity>>. Acesso em: 18 abr 2023.

GOSHUA, George e colab. **Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study**. *The Lancet. Haematology*, v. 7, n. 8, p. e575–e582, 1 Ago 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619411/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

GRANT, Rogan A. e colab. **Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia**. *Nature*, v. 590, n. 7847, p. 635–641, 25 Fev 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33429418/>>. Acesso em: 14 abr 2023.

GRUNDMANN, Alexander e colab. **Fewer COVID-19 Neurological Complications with Dexamethasone and Remdesivir**. *Annals of Neurology*, v. 93, n. 1, p. 88–102, 1 Jan 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.26536>>. Acesso em: 17 abr 2023.

GRUNDY, Seamus e colab. **Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells**.

Respiratory research, v. 17, n. 1, 25 Jan 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26809346/>>. Acesso em: 6 maio 2023.

GUAN, Wei-jie e colab. **Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China**. New England Journal of Medicine, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 Abr 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2002032>>. Acesso em: 5 maio 2021.

GUO, Qirui e colab. **Induction of alarmin S100A8/A9 mediates activation of aberrant neutrophils in the pathogenesis of COVID-19**. Cell Host & Microbe, v. 29, p. 222–235, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.12.016>>. Acesso em: 15 abr 2023.

GUO, Zhen Dong e colab. **Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020**. Emerging Infectious Diseases, v. 26, n. 7, p. 1586, 1 Jul 2020. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC7323510/>>. Acesso em: 25 fev 2023.

HATZELMANN, A., & SCHUDT, C. **Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro**. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 297, n. 1, p. 267–279, 2001. Disponível em: <<https://jpet.aspetjournals.org/content/297/1/267.short>>. Acesso em: 18 jun 2021.

HE, Xi e colab. **Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19**. Nature Medicine 2020 26:5, v. 26, n. 5, p. 672–675, 15 Abr 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0869-5>>. Acesso em: 25 fev 2023.

HENRY, Brandon Michael e colab. **Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis**. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 25 Jun 2020. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2020-0369/html>>. Acesso em: 26 mar 2023.

HEYSTEK, Heleen C. e colab. **Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine production and Th 1-polarizing**

capacity. International Immunology. [S.l.]: Oxford University Press. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12807821/>>. Acesso em: 16 jun 2021. , 1 Jul 2003

HOFFMANN, Markus e colab. **SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.** Cell, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 16 Abr 2020. Acesso em: 18 mar 2023.

HOU, Yixuan J. e colab. **SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract.** Cell, v. 182, n. 2, p. 429- 446.e14, 23 Jul 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867420306759/fulltext>>. Acesso em: 11 abr 2023.

HUANG, Chaolin e colab. **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.** The Lancet, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

K, Ito e colab. **Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression.** The Journal of experimental medicine, v. 203, n. 1, p. 7–14, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16380507/>>. Acesso em: 6 maio 2023.

KALIL, Andre C. e colab. **Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19.** The New England journal of medicine, v. 384, n. 9, p. 795–807, 4 Mar 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33306283/>>. Acesso em: 30 abr 2023.

KAMENETSKY, Margarita e colab. **Molecular Details of cAMP Generation in Mammalian Cells: A Tale of Two Systems.** Journal of Molecular Biology. [S.l.]: Academic Press. . Acesso em: 9 jun 2021. , 29 Set 2006

KARAGIANNIDIS, Christian e colab. **Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 114, n. 6, p. 1425–1433, Dez 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15577848/>>. Acesso em: 19 abr 2023.

KARKI, Rajendra e colab. **Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes.** Cell, v. 184, n. 1, p. 149- 168.e17, 7 Jan 2021. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867420315427/fulltext>>. Acesso em: 14 abr 2023.

KATSURA, Hiroaki e colab. **Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction.** *Cell Stem Cell*, v. 27, n. 6, p. 890- 904.e8, 3 Dez 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S1934590920304999/fulltext>>. Acesso em: 15 abr 2023.

KATZENSTEIN, A. L.A. e BLOOR, C. M. e LEIBOW, A. A. **Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review.** *The American Journal of Pathology*, v. 85, n. 1, p. 209, 1976. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2032554/>>. Acesso em: 12 abr 2023.

KE, Sheldon e colab. **Shaping the murine macrophage phenotype: IL-4 and cyclic AMP synergistically activate the arginase I promoter.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 191, n. 5, p. 2290–2298, 1 Set 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23913966/>>. Acesso em: 7 ago 2021.

KELLY-SCUMPIA, Kindra M. e colab. **ER Stress Regulates Immunosuppressive Function of Myeloid Derived Suppressor Cells in Leprosy that Can Be Overcome in the Presence of IFN- γ .** *iScience*, v. 23, n. 5, 22 Maio 2020.

KHAN, Mona e colab. **Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb.** *Cell*, v. 184, n. 24, p. 5932- 5949.e15, 24 Nov 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34798069/>>. Acesso em: 11 abr 2023.

KINO, Tomoshige e colab. **Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress.** *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, v. 21, n. 7, p. 1552–1568, Jul 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17440046/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

KINO, Tomoshige e CHROUSOS, George P. **Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases.** *Essays in biochemistry*, v. 40, p. 137–155, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15242344/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

KONRAD, Franziska M. e colab. **The Unrecognized Effects of Phosphodiesterase 4 on Epithelial Cells in Pulmonary Inflammation.** PLOS ONE, v. 10, n. 4, p. e0121725, 24 Abr 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0121725>>. Acesso em: 21 abr 2023.

KÖRNER, Robert W. e colab. **Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2.** Viruses 2020, Vol. 12, Page 880, v. 12, n. 8, p. 880, 12 Ago 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/880/htm>>. Acesso em: 16 abr 2022.

KRIJNSE-LOCKER, Jacomine e colab. **Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step.** The Journal of Cell Biology, v. 124, n. 1, p. 55, 1 Jan 1994. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2119890/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12119890/?report=abstract)>. Acesso em: 20 mar 2023.

KUSNADI, Anthony e colab. **Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells.** Science immunology, v. 6, n. 55, 29 Jan 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33478949/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

KUZIEL, William A. e colab. **Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 22, p. 12053–12058, 28 Out 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9342361/>>. Acesso em: 23 abr 2023.

LAMONTAGNE, François e colab. **A living WHO guideline on drugs for covid-19.** The BMJ, v. 370, p. m3379, 4 Set 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32887691/>>. Acesso em: 25 abr 2023.

LEE, Byung Cheol e colab. **Dexamethasone Inhibits Synergistic Induction of PDE4B Expression by Roflumilast and Bacterium NTHi.** International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 3511, v. 19, n. 11, p. 3511, 8 Nov 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3511/htm>>. Acesso em: 6 maio 2023.

LEE, Pui Y e colab. **Ly6 family proteins in neutrophil biology**. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, n. 4, p. 585–594, 1 Out 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jleukbio/article/94/4/585/6959607>>. Acesso em: 23 abr 2023.

LEVERRIER, Yann e RIDLEY, Anne J. **Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages**. *Current Biology*, v. 11, n. 3, p. 195–199, 6 Fev 2001. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0960982201000471/fulltext>>. Acesso em: 7 ago 2021.

LEVI, Marcel e VAN DER POLL, Tom. **Coagulation and sepsis**. *Thrombosis Research*, v. 149, p. 38–44, 1 Jan 2017. Disponível em: <<http://www.thrombosisresearch.com/article/S0049384816306193/fulltext>>. Acesso em: 13 abr 2023.

LI, Heng e colab. **Inhibition of phosphodiesterase-4 attenuates murine ulcerative colitis through interference with mucosal immunity**. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 13, p. 2209–2226, 1 Jul 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.14667>>. Acesso em: 23 abr 2023.

LI, Heng e ZUO, Jianping e TANG, Wei. **Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. OCT, p. 1048, 17 Out 2018. Acesso em: 16 abr 2023.

LIAO, Danying e colab. **Haematological characteristics and risk factors in the classification and prognosis evaluation of COVID-19: a retrospective cohort study**. *The Lancet. Haematology*, v. 7, n. 9, p. e671–e678, 1 Set 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32659214/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

LIAO, Mingfeng e colab. **Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19**. *Nature Medicine* 2020 26:6, v. 26, n. 6, p. 842–844, 12 Maio 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0901-9>>. Acesso em: 9 jun 2022.

LIMA, Kátia M. e colab. **The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1**. *The Journal of biological chemistry*, v. 292, n. 33, p. 13758–13773, 18 Ago 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655761/>>. Acesso em: 29 mar 2022.

LIU, Tao e colab. **The Potential Role of IL-6 in Monitoring Coronavirus Disease 2019**. SSRN Electronic Journal, 24 Mar 2020. Disponível em: <<https://papers.ssrn.com/abstract=3548761>>. Acesso em: 15 maio 2021.

LIU, Ting e colab. **NF-κB signaling in inflammation**. Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 2, p. 17023, 2017. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC5661633/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

LONG, Brit e colab. **Cardiovascular complications in COVID-19**. The American journal of emergency medicine, v. 38, n. 7, p. 1504–1507, 1 Jul 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32317203/>>. Acesso em: 25 fev 2023.

LOUW, C. e colab. **Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, reduces airway hyperresponsiveness after allergen challenge**. Respiration; international review of thoracic diseases, v. 74, n. 4, p. 411–417, Jul 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16954654/>>. Acesso em: 29 mar 2022.

LUGNIER, Claire e AL-KURAIISHY, Hayder M. e ROUSSEAU, Eric. **PDE4 inhibition as a therapeutic strategy for improvement of pulmonary dysfunctions in Covid-19 and cigarette smoking**. Biochemical pharmacology, v. 185, 1 Mar 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33515531/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

LUYTJES, Willem e colab. **Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site**. Virology, v. 161, n. 2, p. 479–487, 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2825419/>>. Acesso em: 15 mar 2023.

MACPHEE, Peggy J. e colab. **Acute and chronic changes in the microcirculation of the liver in inbred strains of mice following infection with mouse hepatitis virus type 3**. Hepatology (Baltimore, Md.), v. 5, n. 4, p. 649–660, 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2991107/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

MAO, Ling e colab. **Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China**. JAMA neurology, v. 77, n. 6, p. 683–

690, 1 Jun 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32275288/>>. Acesso em: 25 fev 2023.

MAO, Ren e colab. **Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis**. The lancet. Gastroenterology & hepatology, v. 5, n. 7, p. 667–678, 1 Jul 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32405603/>>. Acesso em: 25 fev 2023.

MARCONI, Vincent C. e colab. **Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial**. The Lancet Respiratory Medicine, v. 9, n. 12, p. 1407–1418, 1 Dez 2021. Acesso em: 30 abr 2023.

MARTORANA, Piero A. e colab. **Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke**. American journal of respiratory and critical care medicine, v. 172, n. 7, p. 848–853, 1 Out 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15961691/>>. Acesso em: 6 maio 2023.

MATSUYAMA, Shutoku e colab. **Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2**. Journal of Virology, v. 84, n. 24, p. 12658–12664, 15 Dez 2010. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jvi>>. Acesso em: 18 mar 2023.

MCCOLL, Aisleen e colab. **Glucocorticoids Induce Protein S-Dependent Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Human Macrophages**. The Journal of Immunology, v. 183, n. 3, p. 2167–2175, 1 Ago 2009. Acesso em: 18 abr 2023.

MELMS, Johannes C. e colab. **A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19**. Nature 2021 595:7865, v. 595, n. 7865, p. 114–119, 29 Abr 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-021-03569-1>>. Acesso em: 12 abr 2023.

MENG, Xiao Ming e NIKOLIC-PATERSON, David J. e LAN, Hui Yao. **TGF- β : the master regulator of fibrosis**. Nature Reviews Nephrology 2016 12:6, v. 12, n. 6, p. 325–338, 25 Abr 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrneph.2016.48>>. Acesso em: 29 mar 2022.

MENTER, Thomas e colab. **Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction.** *Histopathology*, v. 77, n. 2, p. 198–209, 1 Ago 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32364264/>>. Acesso em: 13 abr 2023.

MERAD, Miriam e colab. **The immunology and immunopathology of COVID-19.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 11 Mar 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35271343/>>. Acesso em: 25 mar 2023.

MILARA, Javier e colab. **Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist.** *Respiratory Research*, v. 16, n. 1, p. 1–16, 5 Fev 2015. Disponível em: <<https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-015-0179-5>>. Acesso em: 6 maio 2023.

MIOTLA, Jadwiga M. e TEIXEIRA, Mauro M. e HELLEWELL, Paul G. **Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4.** *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 18, n. 3, p. 411–420, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9490659/>>. Acesso em: 30 abr 2023.

MONTO, A. S. **Medical reviews. Coronaviruses.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 234, 1974. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2595130/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

MORENS, David M. e FOLKERS, Gregory K. e FAUCI, Anthony S. **The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases.** *Nature*, v. 430, n. 6996, p. 242–249, 8 Jul 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15241422/>>. Acesso em: 7 maio 2023.

NARAYANAN, Krishna e colab. **Characterization of the Coronavirus M Protein and Nucleocapsid Interaction in Infected Cells.** *Journal of Virology*, v. 74, n. 17, p. 8127–8134, Set 2000. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.74.17.8127-8134.2000>>. Acesso em: 20 mar 2023.

NEGREIROS-LIMA, Grazielle L. e colab. **Cyclic AMP Regulates Key Features of Macrophages via PKA: Recruitment, Reprogramming and Efferocytosis**. Cells, v. 9, n. 1, p. 128, 6 Jan 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/128/htm>>. Acesso em: 7 ago 2021.

NICOLAI, Leo e colab. **Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy**. Circulation, p. 1176–1189, 2020. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>. Acesso em: 1 jun 2021.

OKUN, Jürgen G. e colab. **Molecular regulation of urea cycle function by the liver glucocorticoid receptor**. Molecular Metabolism, v. 4, n. 10, p. 732–740, 1 Out 2015.

ORENSTEIN, Jan M. e BANACH, Bridget S. e BAKER, Susan C. **Morphogenesis of Coronavirus HCoV-NL63 in Cell Culture: A Transmission Electron Microscopic Study**. The open infectious diseases journal, v. 2, n. 1, p. 52, 1 Jan 2008. Disponível em: <pmc/articles/PMC2763395/>. Acesso em: 20 mar 2023.

OWENS, A. Phillip e MACKMAN, Nigel. **Tissue factor and thrombosis: The clot starts here**. Thrombosis and Haemostasis, v. 104, n. 3, p. 432–439, Set 2010. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1160/TH09-11-0771>>. Acesso em: 12 abr 2023.

P, Horby e colab. **Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19**. The New England journal of medicine, v. 384, n. 8, p. 693–704, 25 Fev 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32678530/>>. Acesso em: 9 abr 2023.

PAGE, Clive e PITCHFORD, Simon. **Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation**. International Immunopharmacology, v. 17, n. 4, p. 1176–1184, 1 Dez 2013. Acesso em: 13 abr 2023.

PALLER, Amy S. e colab. **Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults**. Journal of the American

Academy of Dermatology, v. 75, n. 3, p. 494- 503.e6, 1 Set 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27417017/>>. Acesso em: 1 maio 2023.

PANIGADA, Mauro e colab. **Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis**. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, v. 18, n. 7, p. 1738–1742, 1 Jul 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302438/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

PARK, Chan Kwon e colab. **Synergistic effect of roflumilast with dexamethasone in a neutrophilic asthma mouse model**. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 49, n. 6, p. 624–632, 1 Jun 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1440-1681.13635>>. Acesso em: 9 abr 2023.

PARKS, Brian W. e colab. **CD36, but not G2A, modulates efferocytosis, inflammation, and fibrosis following bleomycin-induced lung injury [S]**. Journal of Lipid Research, v. 54, n. 4, p. 1114–1123, 1 Abr 2013. Disponível em: <<http://www.jlr.org/article/S00222752042214X/fulltext>>. Acesso em: 7 ago 2021.

PEIRIS, J. S.M. e colab. **Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome**. Lancet, v. 361, n. 9366, p. 1319–1325, 19 Abr 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12711465/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

PONTELLI, Marjorie C. e colab. **SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients**. Journal of molecular cell biology, v. 14, n. 4, 1 Abr 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35451490/>>. Acesso em: 15 maio 2023.

PONTI, Giovanni e colab. **Biomarkers associated with COVID-19 disease progression**. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1770685>, p. 389–399, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408363.2020.1770685>>. Acesso em: 26 mar 2023.

PRESCOTT, Hallie C. e RICE, Todd W. **Corticosteroids in COVID-19 ARDS: Evidence and Hope During the Pandemic**. JAMA, v. 324, n. 13, p. 1292–1295, 6

Out 2020. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2770275>>. Acesso em: 16 maio 2023.

RABE, Klaus F. e colab. **Roflumilast - An oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial.** Lancet, v. 366, n. 9485, p. 563–571, 13 Ago 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16099292/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

RADERMECKER, Coraline e colab. **Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19.** Journal of Experimental Medicine, v. 217, n. 12, 7 Dez 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20201012>>. Acesso em: 29 abr 2023.

RAHI, Mandeep Singh e colab. **Hematologic disorders associated with COVID-19: a review.** Annals of hematology, v. 100, n. 2, p. 309–320, 1 Feb 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33415422/>>. Acesso em: 2 mar 2023.

RAJ, V. Stalin e colab. **MERS: emergence of a novel human coronavirus.** Current Opinion in Virology, v. 5, n. 1, p. 58–62, 1 Abr 2014. Acesso em: 25 fev 2023.

RANIERI, V. Marco e colab. **Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition.** JAMA, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 13 Jun 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22797452/>>. Acesso em: 13 abr 2023.

RAUCCI, Federica e colab. **Interleukin-17A (IL-17A), a key molecule of innate and adaptive immunity, and its potential involvement in COVID-19-related thrombotic and vascular mechanisms.** Autoimmunity Reviews, v. 19, n. 7, p. 102572, 1 Jul 2020. Acesso em: 17 abr 2023.

REINHARDT, Christoph e colab. **Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation.** The Journal of clinical investigation, v. 118, n. 3, p. 1110–1122, Mar 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18274674/>>. Acesso em: 13 abr 2023.

REMAP-CAP INVESTIGATORS. **Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19.** New England Journal of Medicine, v. 384, n. 16,

p. 1491–1502, 22 Abr 2021. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2100433>>. Acesso em: 30 abr 2023.

RENNARD, Stephen I. e colab. **Reduction of exacerbations by the PDE4 inhibitor roflumilast - the importance of defining different subsets of patients with COPD**. Respiratory Research, v. 12, n. 1, 27 Jan 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21272339/>>. Acesso em: 16 jun 2021.

S, Sugin Lal Jabaris e V, Ranju. **Scope of adjuvant therapy using roflumilast, a PDE-4 inhibitor against COVID-19**. Pulmonary pharmacology & therapeutics, v. 66, 1 Fev 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33259924/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

SAKKAS, Lazaros I. e MAVROPOULOS, Athanasios e BOGDANOS, Dimitrios P. **Phosphodiesterase 4 Inhibitors in Immune-mediated Diseases: Mode of Action, Clinical Applications, Current and Future Perspectives**. Current Medicinal Chemistry, v. 24, n. 28, 30 Maio 2017. Acesso em: 17 jun 2021.

SALAHUDEEN, Ameen A. e colab. **Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in human distal lung organoids**. Nature 2020 588:7839, v. 588, n. 7839, p. 670–675, 25 Nov 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-3014-1>>. Acesso em: 11 abr 2023.

SAMIR, Parimal e MALIREDDI, R. K.Subbarao e KANNEGANTI, Thirumala Devi. **The PANOptososome: A Deadly Protein Complex Driving Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PANOptosis)**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 10, p. 238, 3 Jun 2020. Acesso em: 14 abr 2023.

SASSONE-CORSI, Paolo. **Transcription factors responsive to cAMP**. Annual Review of Cell and Developmental Biology. [S.l.]: Annual Reviews Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8689562/>>. Acesso em: 9 jun 2021. , 1995

SCHAFER, Peter. **Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis**. Biochemical Pharmacology. [S.l.]: Elsevier Inc. . Acesso em: 17 jun 2021. , 15 Jun 2012

SCHIOPPA, Tiziana e colab. **The PDE4 Inhibitor Tanimilast Restrains the Tissue-Damaging Properties of Human Neutrophils**. International Journal of

Molecular Sciences, v. 23, n. 9, p. 4982, 1 Maio 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/4982/htm>>. Acesso em: 21 abr 2023.

SCHULTE-SCHREPPING, Jonas e colab. **Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment**. Cell, v. 182, n. 6, p. 1419- 1440.e23, 17 Set 2020. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867420309922/fulltext>>. Acesso em: 15 abr 2023.

SERHAN, Charles N. e CHIANG, Nan e VAN DYKE, Thomas E. **Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators**. Nature Reviews Immunology. [S.l.]: NIH Public Access. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17576549/>>. Acesso em: 30 jul 2020. , Maio 2008

SHABB, John B. **Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase**. Chemical Reviews, v. 101, n. 8, p. 2381–2411, Ago 2001. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr000236l>>. Acesso em: 9 jun 2021.

SHARMA, Geeta e colab. **Reduction of influenza virus-induced lung inflammation and mortality in animals treated with a phosphodiesterase-4 inhibitor and a selective serotonin reuptake inhibitor**. Emerging Microbes & Infections, v. 2, n. 8, p. e54, 21 Ago 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/>>. Acesso em: 6 maio 2023.

SHI, Jianzhong e colab. **Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2**. Science, v. 368, n. 6494, p. 1016–1020, 29 Maio 2020. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/368/6494/1016>>. Acesso em: 7 ago 2021.

SIA, Sin Fun e colab. **Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters**. Nature 2020 583:7818, v. 583, n. 7818, p. 834–838, 14 Maio 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2342-5>>. Acesso em: 7 ago 2021.

SILVERMAN, Marni N. e STERNBERG, Esther M. **Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction**. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1261, n. 1, p. 55–63, 1 Jul 2012. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x>>. Acesso em: 18 abr 2023.

SIMMONS, Graham e colab. **Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 33, p. 11876–11881, 16 Ago 2005. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0505577102>>. Acesso em: 18 mar 2023.

SIN, Don D. e MAN, S. F. Paul. Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. 2005, [S.l.]: Proc Am Thorac Soc, 2005. p. 8–11. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16113462/>>. Acesso em: 18 jun 2021.

SINGH, Manmeet e colab. **Intracranial Inoculation Is More Potent Than Intranasal Inoculation for Inducing Optic Neuritis in the Mouse Hepatitis Virus-Induced Model of Multiple Sclerosis**. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 8, n. SEP, 4 Set 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30234031/>>. Acesso em: 29 abr 2023.

SINHA, Sarthak e colab. **Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19**. Nature Medicine 2021 28:1, v. 28, n. 1, p. 201–211, 15 Nov 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01576-3>>. Acesso em: 19 abr 2023.

SKENDROS, Panagiotis e colab. **Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis**. The Journal of clinical investigation, v. 130, n. 11, p. 6151–6157, 2 Nov 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32759504/>>. Acesso em: 13 abr 2023.

SNIJDER, E. J. e DECROLY, E. e ZIEBUHR, J. **The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing**. Advances in Virus Research, v. 96, p. 59–126, 1 Jan 2016. Acesso em: 15 mar 2023.

SOUSA, Lirlândia P. e colab. **Cyclic AMP enhances resolution of allergic pleurisy by promoting inflammatory cell apoptosis via inhibition of PI3K/Akt and**

NF-κB. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, n. 4, p. 396–405, 15 Ago 2009. Acesso em: 29 mar 2022.

SOUSA, Lirlândia P. e colab. **PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner**. *Journal of leukocyte biology*, v. 87, n. 5, p. 895–904, Maio 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20103769/>>. Acesso em: 29 mar 2022.

SOUZA, Danielle G. e colab. **Effects of inhibition of PDE4 and TNF-α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury**. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 5, p. 985–994, 1 Nov 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0704336>>. Acesso em: 30 abr 2023.

STERNE, Jonathan A.C. e colab. **Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis**. *JAMA*, v. 324, n. 13, p. 1330–1341, 6 Out 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2770279>>. Acesso em: 17 abr 2023.

SUBRAMANIAN, Manikandan e colab. **An AXL/LRP-1/RANBP9 complex mediates DC efferocytosis and antigen cross-presentation in vivo**. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 3, p. 1296–1308, 3 Mar 2014. Disponível em: <<http://www.jci.org>>. Acesso em: 14 abr 2023.

SUCKOW, Mark A. e HASHWAY, Sara A. e PRITCHETT-CORNING, Kathleen R. **The laboratory mouse**. 3rd. ed. [S.l.: s.n.], 2023. Disponível em: <<https://www.routledge.com/The-Laboratory-Mouse/Suckow-Hashway-Pritchett-Corning/p/book/9780367373207>>. Acesso em: 1 maio 2023.

SURJIT, Milan e LAL, Sunil K. **The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities**. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 8, n. 4, p. 397–405, Jul 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17881296/>>. Acesso em: 20 mar 2023.

SWARTZ, Stephen L. e DLUHY, Robert G. **Corticosteroids: Clinical Pharmacology and Therapeutic Use**. *Drugs* 1978 16:3, v. 16, n. 3, p. 238–255, 9 Nov 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-197816030-00006>>. Acesso em: 18 abr 2023.

SWIERINGA, Frauke e colab. **Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation**. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, v. 2, n. 3, p. 450, 2018. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6046596/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3046596/)>. Acesso em: 12 abr 2023.

T, Veremeyko e colab. **Cyclic AMP Pathway Suppress Autoimmune Neuroinflammation by Inhibiting Functions of Encephalitogenic CD4 T Cells and Enhancing M2 Macrophage Polarization at the Site of Inflammation**. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. JAN, 25 Jan 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29422898/>>. Acesso em: 7 ago 2021.

TAN, Wenjie e colab. **A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020**. *China CDC Weekly*, 2020, Vol. 2, Issue 4, Pages: 61-62, v. 2, n. 4, p. 61–62, 1 Jan 2020. Disponível em: <<https://weekly.chinacdc.cn/en/article/doi/10.46234/ccdcw2020.017>>. Acesso em: 25 fev 2023.

TANNHEIMER, Stacey L. e colab. **Additive anti-inflammatory effects of beta 2 adrenoceptor agonists or glucocorticosteroid with roflumilast in human peripheral blood mononuclear cells**. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 25, n. 2, p. 178–184, 1 Abr 2012. Acesso em: 6 maio 2023.

TAVARES, Luciana P. e colab. **Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation**. *Pharmacological Research*, v. 159, n. May, p. 105030, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105030>>.

TAVARES, Luciana P. e GARCIA, Cristiana C. e e colab. **Inhibition of phosphodiesterase-4 during pneumococcal pneumonia reduces inflammation and lung injury in mice**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 55, n. 1, p. 24–34, 1 Jul 2016. Disponível em: <www.atsjournals.org>. Acesso em: 29 mar 2022.

TAVARES, Luciana P. e TEIXEIRA, Mauro M. e GARCIA, Cristiana C. **The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword.** *Inflammation Research* 2016 66:4, v. 66, n. 4, p. 283–302, 15 Out 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00011-016-0996-0>>. Acesso em: 5 mar 2023.

TEIXEIRA, M. M. e colab. **Phosphodiesterase (PDE)4 inhibitors: Anti-inflammatory drugs of the future?** *Trends in Pharmacological Sciences*. [S.l.]: Elsevier Ltd. . Acesso em: 13 jun 2021. , 1 Maio 1997

TERPOS, Evangelos e colab. **Hematological findings and complications of COVID-19.** *American Journal of Hematology*, v. 95, n. 7, p. 834, 1 Jul 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7262337/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3262337/)>. Acesso em: 2 mar 2023.

TISONCIK, J. R. e colab. **Into the Eye of the Cytokine Storm.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 76, n. 1, p. 16–32, 1 Mar 2012. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3294426/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2294426/)>. Acesso em: 16 maio 2021.

TOORI, Kaleem Ullah e colab. **Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) in COVID-19: A cheap prognostic marker in a resource constraint setting.** *Pakistan Journal of Medical Sciences*, v. 37, n. 5, p. 1435, 1 Set 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC8377926/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3577926/)>. Acesso em: 2 mar 2023.

TOOZE, J e TOOZE, S e WARREN, G. **Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions.** *European journal of cell biology*, v. 33, n. 2, p. 281–293, 1984. Acesso em: 20 mar 2023.

TOTANI, L. e colab. **Roflumilast inhibits leukocyte-platelet interactions and prevents the prothrombotic functions of polymorphonuclear leukocytes and monocytes.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 14, n. 1, p. 191–204, 1 Jan 2016. Acesso em: 18 jun 2021.

TSITOURA, Daphne C. e ROTHMAN, Paul B. **Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells.** *The Journal of clinical investigation*, v. 113, n. 4, p. 619–627, 15 Fev 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14966571/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

TUOSTO, Loretta e colab. **Analysis of susceptibility of mature human T lymphocytes to dexamethasone-induced apoptosis.** European Journal of Immunology, v. 24, n. 5, p. 1061–1065, 1 Maio 1994. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830240508>>. Acesso em: 1 maio 2023.

VAGO, Juliana P. e colab. **Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis.** Journal of leukocyte biology, v. 92, n. 2, p. 249–258, Ago 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22493082/>>. Acesso em: 29 mar 2022.

VAN DE VEERDONK, Frank L. e colab. **A guide to immunotherapy for COVID-19.** Nature Medicine 2022 28:1, v. 28, n. 1, p. 39–50, 21 Jan 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-021-01643-9>>. Acesso em: 30 abr 2023.

VAN DER POUW KRAAN, Tineke C.T.M. e colab. **Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production.** Journal of Experimental Medicine, v. 181, n. 2, p. 775–779, 1 Fev 1995. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/181/2/775/1106352/775.pdf>>. Acesso em: 30 abr 2023.

VAN DOREMALEN, Neeltje e colab. **Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1.** New England Journal of Medicine, v. 382, n. 16, p. 1564–1567, 16 Abr 2020. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2004973>>. Acesso em: 25 fev 2023.

VAN SCHALKWYK, Emmerentia e colab. **Roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates allergen-induced asthmatic reactions.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 116, n. 2, p. 292–298, 1 Ago 2005. Disponível em: <<http://www.jacionline.org/article/S0091674905007669/fulltext>>. Acesso em: 29 mar 2022.

VARGA, Zsuzsanna e colab. **Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19.** Lancet (London, England), v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2 Maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32325026/>>. Acesso em: 26 mar 2023.

VICTONI, Tatiana e colab. **Roflumilast N-Oxide Prevents Cytokine Secretion Induced by Cigarette Smoke Combined with LPS through JAK/STAT and ERK1/2 Inhibition in Airway Epithelial Cells**. PLOS ONE, v. 9, n. 1, p. e85243, 8 Jan 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085243>>. Acesso em: 23 abr 2023.

VIEIRA-ALVES, Ildernandes e colab. **TNF/iNOS/NO pathway mediates host susceptibility to endothelial-dependent circulatory failure and death induced by betacoronavirus infection**. Clinical Science, v. 137, n. 7, p. 543–559, 13 Abr 2023. Disponível em: <clinsci/article/137/7/543/232803/TNF-iNOS-NO-pathway-mediates-host-susceptibility>. Acesso em: 15 maio 2023.

VON BRÜHL, Marie Luise e colab. **Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo**. The Journal of experimental medicine, v. 209, n. 4, p. 819–835, 9 Abr 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22451716/>>. Acesso em: 13 abr 2023.

WAN, Qing e colab. **Targeting PDE4B (Phosphodiesterase-4 Subtype B) for Cardioprotection in Acute Myocardial Infarction via Neutrophils and Microcirculation**. Circulation Research, v. 131, n. 5, p. 442–455, 19 Ago 2022. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.122.321365>>. Acesso em: 21 abr 2023.

WEIKUM, Emily R. e colab. **Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery**. Nature reviews. Molecular cell biology, v. 18, n. 3, p. 159–174, 1 Mar 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28053348/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

WHITE, William B. e colab. **Cardiovascular safety in patients receiving roflumilast for the treatment of COPD**. Chest, v. 144, n. 3, p. 758–765, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23412642/>>. Acesso em: 18 jun 2021.

WIERSINGA, W. Joost e colab. **Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review**. JAMA, v. 324,

n. 8, p. 782–793, 25 Ago 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32648899/>>. Acesso em: 25 fev 2023.

WILK, Aaron J. e colab. **A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19**. *Nature Medicine* 2020 26:7, v. 26, n. 7, p. 1070–1076, 8 Jun 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0944-y>>. Acesso em: 15 abr 2023.

WILLIAMS, R. K. e JIANG, G. S. e HOLMES, K. V. **Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 13, p. 5533, 7 Jul 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/167222/>>. Acesso em: 18 mar 2023.

WINKLER, Emma S. e colab. **SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function**. *Nature Immunology* 2020 21:11, v. 21, n. 11, p. 1327–1335, 24 Ago 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41590-020-0778-2>>. Acesso em: 8 ago 2021.

WITTMANN, Miriam e HELLIWELL, Philip S. **Phosphodiesterase 4 inhibition in the treatment of psoriasis, psoriatic arthritis and other chronic inflammatory diseases**. *Dermatology and Therapy*. [S.l.]: Springer Healthcare. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23888251/>>. Acesso em: 13 jun 2021. , 1 Jun 2013

WÜST, Simone e colab. **Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis**. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 180, n. 12, p. 8434–8443, 15 Jun 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18523311/>>. Acesso em: 18 abr 2023.

XIANG, Qun e colab. **SARS-CoV-2 Induces Lymphocytopenia by Promoting Inflammation and Decimates Secondary Lymphoid Organs**. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 1292, 28 Abr 2021. Acesso em: 15 maio 2023.

YANG, Zhangsheng e colab. **Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice**. *Virologica Sinica*, v. 29, n. 6, p. 393–402, 1 Dez 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547683/>>. Acesso em: 13 jun 2021.

YE, Yumei e colab. **Phosphorylation of 5-Lipoxygenase at Ser523 by Protein Kinase A Determines Whether Pioglitazone and Atorvastatin Induce Proinflammatory Leukotriene B4 or Anti-Inflammatory 15-Epi-Lipoxin A4 Production.** *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 5, p. 3515–3523, 1 Set 2008. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/181/5/3515>>. Acesso em: 5 abr 2022.

YOSHIMOTO, Francis K. **A Biochemical Perspective of the Nonstructural Proteins (NSPs) and the Spike Protein of SARS CoV-2.** *Protein Journal*, v. 40, n. 3, p. 260–295, 1 Jun 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10930-021-09967-8>>. Acesso em: 18 mar 2023.

ZANZA, Christian e colab. **Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy.** *Medicina* 2022, Vol. 58, Page 144, v. 58, n. 2, p. 144, 18 Jan 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1648-9144/58/2/144/htm>>. Acesso em: 15 abr 2023.

ZENG, Si e colab. **High-dose dexamethasone induced LPS-stimulated rat alveolar macrophages apoptosis.** *Drug design, development and therapy*, v. 11, p. 3097–3104, 25 Out 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29123381/>>. Acesso em: 1 maio 2023.

ZHA, Duoduo e FU, Mingui e QIAN, Yisong. **Vascular Endothelial Glycocalyx Damage and Potential Targeted Therapy in COVID-19.** *Cells*, v. 11, n. 12, 1 Jun 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35741101/>>. Acesso em: 17 abr 2023.

ZHAO, Yu e colab. **Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like T H 17 cells expressing GM-CSF in the lungs of patients with severe COVID-19.** *Sci. Immunol.* [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

ZHENG, Xizi e ZHAO, Youlu e YANG, Li. **Acute Kidney Injury in COVID-19: The Chinese Experience.** *Seminars in Nephrology*, v. 40, n. 5, p. 430–442, 1 Set 2020. Acesso em: 25 fev 2023.

ZHOU, Peng e colab. **A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin.** *Nature* 2020 579:7798, v. 579, n. 7798, p. 270–

273, 3 Fev 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2012-7>>. Acesso em: 29 abr 2023.

ZIEBUHR, John e SNIJDER, Eric J. e GORBALENYA, Alexander E. **Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales**. The Journal of general virology, v. 81, n. Pt 4, p. 853–879, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10725411/>>. Acesso em: 18 mar 2023.