



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Genética, Ecologia e Evolução

Ana Carolina Santos Ricoy

**AVALIAÇÃO DO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS EM MODELOS DE INFECÇÃO
POR BETACORONAVÍRUS: efeitos anti-inflamatório e antiviral da atorvastatina,
dasatinibe e resveratrol**

Belo Horizonte

2025

Ana Carolina Santos Ricoy

**AVALIAÇÃO DO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS EM MODELOS DE INFECÇÃO
POR BETACORONAVÍRUS: efeitos anti-inflamatório e antiviral da atorvastatina,
dasatinibe e resveratrol**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

Belo Horizonte

2025

043

Ricoy, Ana Carolina Santos.

Avaliação do reposicionamento de fármacos em modelos de infecção por betacoronavírus: efeitos anti-inflamatório e antiviral da atorvastatina, dasatinibe e resveratrol [manuscrito] / Ana Carolina Santos Ricoy. – 2025.

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

Orientador: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani.

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

1. Genética. 2. Anti-Inflamatórios. 3. Antivirais. 4. Atorvastatina. 5. Obesidade. 6. Dasatinibe. 7. Vírus da Hepatite Murina. 8. Resveratrol. 9. Betacoronavirus. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



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

ATA DE DEFESA DE TESE DA ALUNA

ANA CAROLINA SANTOS RICOY

Às oito horas e trinta minutos do dia **25 de fevereiro de 2025**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do Reposicionamento de Fármacos em Modelos de Infecção por Betacoronavírus: Efeitos Anti-inflamatório e Antiviral da Atorvastatina, Dasatinibe e Resveratrol**", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dra. Frederico Marianetti Soriani**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Frederico Marianetti Soriani	ICB/UFMG	APROVADA
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	ICB/UFMG	APROVADA
Dra. Marina Chaves de Oliveira	Enfermagem/UFMG	APROVADA
Dra. Cristiana Couto Garcia	Fiocruz Minas	APROVADA
Dra. Jaquelline Germano	Fiocruz Minas	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2025.

Dra. Frederico Marianetti Soriani

Dra. Vivian Vasconcelos Costa

Dra. Marina Chaves de Oliveira

Dra. Cristiana Couto Garcia

Dra. Jaquelline Germano

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 10:54, 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 **Cristiana Couto Garcia, Usuária Externa**, em 28/02/2025, às 15:27, 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 **Jaquelline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 07/03/2025, às 09:28, 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 **3991746** e o código CRC **CC1FCF02**.



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"AVALIAÇÃO DO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS EM MODELOS DE
INFECÇÃO POR BETACORONAVÍRUS: EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIVIRAL DA ATORVASTATINA, DASATINIBE E RESVERATROL"**

ANA CAROLINA SANTOS RICOY

**TESE APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELOS
PROFESSORES:**

Profa Cristiana Couto Garcia
Fiocruz Minas

Profa Jaqueline Germano
Fiocruz Minas

Profa Vivian Vasconcelos Costa
ICB/UFMG

Profa Marina Chaves de Oliveira
Enfermagem/UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2025, às 10:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Couto Garcia, Usuária Externa**, em 28/02/2025, às 15:28, 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 **Jaqueline Germano de Oliveira, Usuário Externo**, em 07/03/2025, às 09:28, 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 **3991748** e o código CRC **E8FD96ED**.

Agradecimentos

Primeiramente sou grata a Deus, o autor da minha vida, pela proteção, saúde, por ouvir as minhas orações e ser minha fonte de força e determinação em todos os momentos.

Agradeço a minha querida mãe Cláudia e família pelo incentivo, carinho e amor que foram essenciais nos momentos difíceis.

Agradeço a minha filha Heloísa, doce e carinhosa princesa com a risada mais gostosa, calmara nos dias de tempestade e minha razão de viver. É pensando nela que eu venço cada obstáculo para conquistar meus objetivos.

Agradeço ao meu amado esposo Evaldo Junio por todo incentivo, apoio, amor e momentos especiais.

Agradeço ao meu orientador Frederico Marianetti Soriani, pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Genética Funcional e por embarcar nessa aventura que foi trabalhar com vírus. Sou grata por todo o conhecimento que adquiri nesses quatro anos sob a sua orientação, pelas conversas e apoio.

Agradeço as meninas do LGF: minha migs querida Marina, Flávia, Bella, Belle, Beatriz, Clariane, Rawane, Isadora, Elisa e Karina. Sou grata pelos momentos especiais, pelas risadas, pelas terapias em grupo, pelo conhecimento e pela amizade. Vocês deixaram meus dias mais leves e felizes!

Agradeço aos integrantes do grupo Imunofar, especialmente a Rose, Ilma, Letícia, Franck, Vivian, Celso, Cíntia, Thales, Isabela, Matheus e Vítor.

Agradeço às minhas amigas de longa data, Amanda e Bianca, pelas conversas, momentos de descontração e incentivo.

Ao meu professor de ciências, Adalberto Pestana, por ser um grande exemplo e inspiração, principal incentivador pelo meu amor pela Biologia nos tempos de escola e até hoje.

Ao Dr. Mauro Martins Teixeira, chefe do Laboratório de Imunofarmacologia, por todo o apoio e suporte, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À UFMG, em especial ao ICB, pela oportunidade de desenvolver pesquisa.

Aos professores por aceitarem compor minha banca.

Ao programa de Pós-graduação em Genética.

À **CAPES, CNPq e Fapemig** pelo apoio financeiro.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Funcional do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o suporte financeiro das agências de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármaco (CPDF) e INCT Dengue e interações microrganismo hospedeiro.

Resumo

Os betacoronavírus são patógenos com potencial pandêmico, como demonstrado pela pandemia de COVID-19 causada por SARS-CoV-2. A gravidade da COVID-19 está associada a altos níveis de mediadores pró-inflamatórios, resultado de uma resposta imune desregulada. A presença de comorbidades durante a COVID-19, incluindo a obesidade, é um fator de risco associado a desfechos graves. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos surge como uma estratégia viável para a identificar novos usos terapêuticos para drogas ou fármacos já aprovados clinicamente. Neste estudo, investigamos os efeitos anti-inflamatório e antiviral dos fármacos atorvastatina, dasatinibe e do composto natural resveratrol em modelos murinos de infecção por betacoronavírus. Além disso, investigamos os efeitos terapêuticos do resveratrol em modelo de obesidade induzido por dieta de cafeteria na infecção pelos vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2. A atorvastatina mostrou efeitos profiláticos *in vitro* em macrófagos durante a infecção por MHV-3, reduzindo os níveis de citocinas IL-6 e TNF, títulos virais e interferindo na replicação durante a adsorção e internalização. Enquanto o tratamento profilático ou terapêutico *in vitro* com dasatinibe reduziu os níveis de IL-6, TNF e CXCL2 e títulos virais do MHV-3. O pré-tratamento com dasatinibe interferiu nas etapas de adsorção e a internalização viral ao reduzir os títulos virais. A sinalização da tirosina quinase SRC revelou ser importante na infecção por MHV-3. O tratamento pós-infecção com dasatinibe modulou negativamente a via de sinalização SRC-MAPK-NF- κ B, reduzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos. A sinalização via SRC pode ser um alvo para intervenções no controle de infecções por coronavírus. Nossos resultados com resveratrol demonstraram o efeito anti-inflamatório tanto *in vitro* ao reduzir os níveis de IL-6, TNF, CXCL2, quanto *in vivo*, reduzindo os níveis de CCL2 e CXCL1 na infecção pelos vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2, ao mesmo tempo que preservou IFN- β ao nível basal em animais com obesidade durante a infecção com o vírus MHV-A59. Observamos que o resveratrol reduziu os títulos virais *in vitro* e no pulmão dos animais com obesidade durante a infecção por MHV-A59 e em animais K18-hACE2, com SARS-CoV-2. Além disso, resveratrol diminuiu os neutrófilos do sangue e pulmão dos animais com obesidade, além de reduzir a ativação dessas células ao reduzir a liberação de ROS na infecção por MHV-A59. O resveratrol normalizou os níveis plasmáticos de glicose, colesterol, triglicérides, leptina e a expressão de TNF no tecido adiposo epididimal, enquanto regulou positivamente os níveis da adiponectina nos animais com obesidade na infecção com MHV-A59. No tecido adiposo visceral dos animais com obesidade, o resveratrol reduziu a carga viral do MHV-A59 no 5 dpi. Nossos dados sugerem que os fármacos atorvastatina, dasatinibe e o composto natural resveratrol representam uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento adjuvante de infecções por coronavírus, evidenciado pelos seus efeitos anti-inflamatórios e antivirais.

Palavras-Chave: Anti-inflamatório; Antiviral; Atorvastatina; Obesidade, Dasatinibe; Vírus da hepatite murina (MHV); Resveratrol; SARS-CoV-2.

Abstract

Betacoronaviruses are pathogens with pandemic potential, as demonstrated by the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2. The severity of COVID-19 is associated with high levels of pro-inflammatory mediators, resulting from a dysregulated immune response. The presence of comorbidities during COVID-19, including obesity, is a risk factor associated with severe outcomes. In this context, drug repurposing emerges as a viable strategy for identifying new therapeutic uses for clinically approved drugs or compounds. In this study, we investigated the anti-inflammatory and antiviral effects of the drugs atorvastatin, dasatinib, and the natural compound resveratrol in murine models of betacoronavirus infection. Additionally, we examined the therapeutic effects of resveratrol in a cafeteria diet-induced obesity model during MHV-A59 and SARS-CoV-2 infection. Atorvastatin exhibited *in vitro* prophylactic effects in macrophages during MHV-3 infection, reducing IL-6 and TNF cytokine levels, lowering viral titers, and interfering with replication during adsorption and internalization. Meanwhile, *in vitro* prophylactic or therapeutic treatment with dasatinib reduced IL-6, TNF, and CXCL2 levels, as well as MHV-3 viral titers. Pre-treatment with dasatinib interfered with viral adsorption and internalization by reducing viral titers, highlighting the importance of SRC tyrosine kinase signaling in MHV-3 infection. Post-infection treatment with dasatinib negatively modulated the SRC-MAPK-NF- κ B signaling pathway, reducing the release of pro-inflammatory mediators by macrophages. SRC signaling may be a potential target for interventions in the control of coronavirus infections. Our results with resveratrol demonstrated its anti-inflammatory effect both *in vitro*, by reducing IL-6, TNF, and CXCL2 levels, and *in vivo*, by decreasing CCL2 and CXCL1 levels during MHV-A59 and SARS-CoV-2 infection, while preserving IFN- β at basal levels in obese animals infected with MHV-A59. We observed that resveratrol reduced viral titers *in vitro*, in the lungs of obese animals infected with MHV-A59, and in K18-hACE2 mice infected with SARS-CoV-2. Additionally, resveratrol decreased neutrophil counts in the blood and lungs of obese animals and reduced neutrophil activation by decreasing ROS release during MHV-A59 infection. Resveratrol also normalized plasma levels of glucose, cholesterol, triglycerides, leptin, and TNF expression in epididymal adipose tissue while upregulating adiponectin levels in obese animals infected with MHV-A59. In the visceral adipose tissue of obese animals, resveratrol reduced MHV-A59 viral load at 5 dpi. Our data suggest that atorvastatin, dasatinib, and the natural compound resveratrol represent a promising therapeutic strategy for adjunctive treatment of coronavirus infections, as evidenced by their anti-inflammatory and antiviral effects.

Keywords: Anti-inflammatory; Antiviral; Atorvastatin; Obesity, Dasatinib; Murine Hepatitis Virus (MHV); Resveratrol; SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética dos coronavírus baseada nas sequências de nucleotídeos da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp).

Figura 2. Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 e o seu genoma.

Figura 3. O ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2.

Figura 4. Diferenças entre os vírus MHV e SARS-CoV-2.

Figura 5. Alteração na população de células imunológicas em resposta à obesidade no tecido adiposo.

Figura 6. Alteração na produção de adipocinas, citocinas e quimiocinas no tecido adiposo magro e tecido adiposo obeso.

Figura 7. Mecanismo de ação das estatinas na biossíntese do colesterol.

Figura 8. Mecanismos moleculares propostos envolvidos nos efeitos das estatinas na COVID-2019.

Figura 9. Reposicionamento de inibidores de tirosina quinase para tratamento terapêutico da COVID-19.

Figura 10. Efeitos terapêuticos do resveratrol em diferentes infecções por vírus respiratórios.

Figura 11. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de obesidade induzido por dieta de cafeteria.

Figure 12. Standardization of MHV-3 infection in RAW 264.7 cell line.

Figure 13. Effects of DASA pre-treatment in macrophages during MHV-3 infection.

Figure 14. Treatment with DASA leads to decreased viral titers of MHV-3 during the initial stages of the viral cycle.

Figure 15. Treatment with DASA post-infection decreases viral titer and pro-inflammatory mediators in macrophages.

Figure 16. Treatment post-infection with DASA promoted negative regulation of the SRC-MAPK-NF- κ B pathway.

Figura 17. Ensaio de citotoxicidade do tratamento com a atorvastatina em macrófagos murinos.

Figura 18. Efeito profilático do tratamento com a atorvastatina em macrófagos durante a infecção com o vírus MHV-3.

Figura 19. O tratamento com atorvastatina reduz os títulos virais do MHV-3 durante os estágios iniciais do ciclo viral.

Figura 20. Padronização da infecção por MHV-A59 em linhagem celular RAW 264.7.

Figura 21. Ensaio de citotoxicidade do resveratrol em macrófagos murinos.

Figura 22. Efeitos profiláticos do resveratrol em macrófagos infectados com diferentes betacoronavírus murinos.

Figura 23. Efeitos terapêuticos do resveratrol em macrófagos pós-infecção com diferentes betacoronavírus murinos.

Figura 24. Efeitos antivirais do pré-tratamento e tratamento pós-infecção com o resveratrol durante infecção por diferentes betacoronavírus murinos.

Figura 25. Tratamento com resveratrol reduz os níveis dos mediadores pró-inflamatórios durante o infecção com diferentes betacoronavírus murinos.

Figura 26. Estabelecimento do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria.

Figura 27. Tratamento com resveratrol protege os animais com obesidade durante a infecção com MHV-A59.

Figura 28. O tratamento com resveratrol reduz a carga viral no pulmão de animais com obesidades.

Figura 29. O tratamento com resveratrol reduz a lesão pulmonar e a inflamação induzidas pela infecção com MHV-A59 em animais com obesidades.

Figura 30. Resveratrol reduz danos pulmonares nos animais com obesidade na infecção por MHV-A59.

Figura 31. Resveratrol reduz a inflamação pulmonar em animais com obesidade na infecção por MHV-A59 no 2 dpi.

Figura 32. Resveratrol reduz a inflamação pulmonar em animais com obesidade na infecção por MHV-A59 no 5 dpi.

Figura 33. Resveratrol reduz os neutrófilos do pulmão dos animais CAF na infecção por MHV-A59.

Figura 34. Resveratrol reduz os neutrófilos do sangue dos animais CAF na infecção por MHV-A59.

Figura 35. Resveratrol atenua a liberação de ROS e NETs pelos neutrófilos de animais CAF durante a infecção pelo MHV-A59.

Figura 36. Resveratrol melhora os parâmetros inflamatórios relacionados a obesidade no contexto de infecção.

Figura 37. Resveratrol melhora os parâmetros metabólicos relacionados a obesidade e reduz a carga viral no tecido adiposo dos animais CAF.

Figura 38. Padronização do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria em animais K18-hACE2.

Figura 39. Resveratrol reduz a população de células, carga viral e a inflamação no pulmão dos animais CAF durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Figura 40. Resveratrol melhora os parâmetros metabólicos associados a obesidade durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição Nutricional das Dietas Controle e Cafeteria.

Tabela 2. Grupos experimentais para o ensaio de ROS em BMDN.

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados na qPCR do pulmão e tecido adiposo visceral epididimal ou gonadal).

LISTA DE ABREVIATURAS

CAF – dieta de cafeteria

CEACAM1 - molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CoV - Coronavírus

COVID-19 – Doença do Coronavírus 2019

COX-2 - ciclooxigenase 2

DC – Dieta convencional

dsRNA - double-stranded RNA

E – Proteína de envelope

ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2

ERGIC - Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi

FDA - *Food and Drug Administration*

FPP - pirofosfato de farnesila

GPP - pirofosfato de geranila

gRNA - RNA genômico

hECA2 -receptor ECA2 humano

HCoV - Coronavírus humano

HIF-1 α - fator induzível por hipóxia-1 alfa

HMG – hidroximetilglutaril

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

hMPV - metapneumovírus humano

IFN- γ - interferon gama

IL-6 – Interleucina 6

IPP - pirofosfato de isopentenila

ITQ's – Inibidores de tirosina quinases

ISGs - genes estimulados por interferons

LMC - leucemia mieloide crônica

MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase

M – proteínas de membrana

MERS-CoV- Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MDCK – linhagem celular Madin-Darby Canine Kidney

MHV- Vírus da Hepatite Murina

N – proteína do nucleocapsídeo

NET's – armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF-κB - fator nuclear-κB

NK - células natural killers

NTD - domínio N-terminal

NO - óxido nítrico

Nrf2 - fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

Nsps - Proteínas não estruturais

ORF - Open Reading Frame

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PD-1 - Programmed Cell Death Protein 1

PDGFR - fator de crescimento derivado de plaquetas

PKC - proteína quinase C

PGE2 -prostaglandina E2

PMA - forbol-12-miristato-13-acetato

pp1 – poliproteína 1

RE - retículo endoplasmático

RdRp- RNA polimerase dependente de RNA

ROS – espécies reativas de oxigênio

RRPs - Receptores de Reconhecimento de Padrões celulares

RTCs - complexos de replicação-transcrição

RSV - vírus sincicial respiratório

+ssRNA - RNA de fita simples sentido positivo

S - Spike

S1/S2 – subunidades 1 e subunidade 2

SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SARS - Síndrome Respiratória Aguda Grave

SDRA - síndrome do desconforto respiratório agudo

sg-mRNAs - conjunto de mRNAs subgenômicos

SNC - sistema nervoso central

SPM - mediadores pró-resolutivos especializados

SRAA - sistema renina-angiotensina-aldosterona

TNF – Fator de necrose tumoral

Th2 - T helper 2

TLRs – receptores do tipo Toll

Treg - células T reguladoras

UTI – unidade de terapia intensiva

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1.1	Diversidade dos Coronavírus	15
1.1.2	Estrutura dos coronavírus e ciclo replicativo	17
1.1.3	Coronavírus murino como modelo para estudo da SARS.....	21
1.1.4	Patogênese da COVID-19	25
1.1.5	Obesidade como um fator de risco na COVID-19.....	28
1.1.6	Tratamento e prevenção na COVID-19.....	33
1.1.7	Reposicionamento de drogas e fármacos.....	34
1.1.8	ESTATINAS - ATORVASTATINA	35
1.1.9	INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE - DASATINIBE.....	40
1.1.10	RESVERATROL.....	45
2.	JUSTIFICATIVA	49
3.	OBJETIVO GERAL	49
3.1	Objetivos específicos	49
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	Cultura de linhagens celulares e vírus.....	51
4.2	Tratamentos com atorvastatina, dasatinibe e resveratrol <i>in vitro</i>	51
4.3	Tratamento com Resveratrol <i>in vivo</i>	52
4.4	Análise da viabilidade celular	52
4.5	Ensaio de adsorção e internalização viral.....	53
4.6	Linhagens de camundongos	54
4.7	Peso Corporal, Consumo de Ração e Índice de Adiposidade.....	55
4.8	Avaliação de parâmetros metabólicos	55
4.9	Infecção por MHV-A59 e SARS-CoV-2.....	56
4.10	Titulação viral.....	56
4.11	Ensaio de citocinas e quimiocinas	57
4.12	Ensaio de ROS.....	57
4.13	Letalidade	58
4.14	Coleta de tecidos e avaliação hematológica.....	59
4.15	Avaliação histopatológica	59
4.16	Parâmetros de dano pulmonar.....	60
4.17	Imunohistoquímica do pulmão	61
4.18	Expressão de genes por PCR em tempo real.....	62
4.19	Análise estatística	63

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Capítulo 1 –Efeitos do tratamento com Dasatinibe em linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectadas com MHV-3	63
5.2	Capítulo 2 - Efeitos do tratamento com Atorvastatina em linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectadas com MHV-3	88
5.3	Capítulo 3- Efeitos do tratamento com resveratrol na linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectada com MHV-3 e MHV-A59, e em modelo murino de obesidade e infecção.	95
5.3.1	O tratamento com resveratrol demonstra efeitos protetores nos animais com obesidade na infecção com MHV-A59	104
5.3.2	Resveratrol atenua a patogênese pulmonar e a inflamação induzida por MHV-A59 em animais com obesidade	105
5.3.3	Resveratrol reduz a migração de neutrófilos em animais com obesidade durante a infecção com MHV-A59.....	111
5.3.4	Resveratrol reduz a ativação dos neutrófilos de animais com obesidade durante infecção com MHV-A59.....	113
5.3.5	Resveratrol melhora os parâmetros relacionados à obesidade e reduz os títulos do MHV-A59 no tecido adiposo dos animais com obesidade.....	114
5.4	Efeitos terapêuticos do resveratrol na infecção por SARS-CoV-2 em modelo K18-hACE2 de obesidade induzida por dieta.....	117
5.4.1	Resveratrol melhora os parâmetros metabólicos associados a obesidade em animais K18-hACE2 na infecção por SARS-CoV-2	122
6.	CONCLUSÃO	135
7.	REFERÊNCIAS	136
8.	ANEXOS	152

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), agente etiológico da COVID-19 (Doença do Coronavírus 2019), foi identificado na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (Zheng, 2020). A disseminação do vírus SARS-CoV-2 ocorreu em uma escala e velocidade sem precedentes, impactando profundamente os sistemas de saúde pública, a economia global e a subsistência de milhões de pessoas no mundo (Zhang *et al.*, 2020). No dia 11 de março de 2020, a OMS declarou a COVID-19, uma doença com alta transmissibilidade e potencialmente fatal, como uma pandemia global (OMS, 2020). A pandemia de COVID-19 resultou em mais de 776 milhões de casos reportados e mais de 7 milhões de mortes no mundo (OMS, 2024).

A infecção pulmonar por SARS-COV-2 afeta tanto as vias aéreas superiores quanto as inferiores, podendo causar uma ampla gama de sintomas respiratórios, pode apresentar desde sintomas leves como tosse, febre, congestão nasal, fadiga (Alimohamadi *et al.*, 2020) a sintomas mais graves como insuficiência respiratória, síndrome respiratória aguda grave (SARS), choque séptico, falência múltipla de órgãos podendo ocasionar a morte (Casella *et al.*, 2020). Além disso, a gravidade da COVID-19 está associada aos altos níveis de mediadores pró e anti-inflamatórios como citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF, e quimiocinas MIP-2, MCP-1 e RANTES resultante de uma resposta imunológica disfuncional (Gomez-Escobar *et al.*, 2021). Essa resposta inflamatória intensa, mediada pela produção descontrolada de mediadores inflamatórios como as citocinas e quimiocinas, também foi observada em infecções virais epidêmicas, como o vírus influenza (Jiang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010), assim como em outros coronavírus, como o SARS-CoV (Huang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2020) e o MERS-CoV (Mubarak *et al.*, 2019; Mahallawi *et al.*, 2018).

Apesar do desenvolvimento bem-sucedido de vacinas durante a pandemia de COVID-19, existe uma constante preocupação relacionada ao potencial surgimento de novas variantes de SARS-CoV-2 (Tregoning *et al.*, 2021) ou até mesmo de outros vírus respiratórios como o vírus Influenza (Wei *et al.*, 2020). Nesse sentido, medicamentos previamente aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e outros órgãos competentes, incluindo fármacos e drogas com potencial antiviral e/ou anti-inflamatório, representam uma estratégia terapêutica viável para o tratamento adjuvante de surtos

causados por vírus emergentes, como observado na pandemia de COVID-19 (Namasivayam *et al.*, 2022). Assim, agentes terapêuticos que regulem a inflamação e/ou limitem a replicação viral podem ser estratégias promissoras no tratamento de infecções virais respiratórias por coronavírus. Nesse contexto, destacam-se a atorvastatina, o dasatinibe e o composto natural resveratrol. Portanto, nossa hipótese é que os fármacos atorvastatina, dasatinibe e o composto natural resveratrol poderiam apresentar efeitos protetores durante a infecção por coronavírus, incluindo efeitos anti-inflamatórios e/ou antivirais, o que poderia reduzir as chances de desenvolvimento da forma grave da doença.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Diversidade dos Coronavírus

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, subordem *Cornidovirineae*, ordem *Nidovirales*. Com base em análises genômicas e filogenéticas, a subfamília *Orthocoronavirinae* compreende quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Körner *et al.*, 2020). Os coronavírus integrantes do gênero *Betacoronavirus* podem infectar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo porcos, gado, camelos, gatos, cães, roedores, aves, morcegos e incluindo hospedeiros humanos (Körner *et al.*, 2020; Wiersinga *et al.*, 2020). Os betacoronavírus nas infecções em humanos, estão associados a surtos zoonóticos nos últimos anos, incluindo MERS-CoV, SARS-CoV e o agente causador da pandemia de COVID-19 denominado SARS-CoV-2 (Boni *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Antes da pandemia de COVID-19, sete coronavírus capazes de infectar humanos haviam sido identificados, incluindo os alfa-coronavírus HCoV-229E e HCoV-NL63, e os betacoronavírus HCoV-HKU1, HCoV-OC43, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e, mais recentemente, o SARS-CoV-2 (Shao *et al.*, 2022; Mollarasouli, Zare-Shehneh e Ghaedi, 2022) (Figura 1).

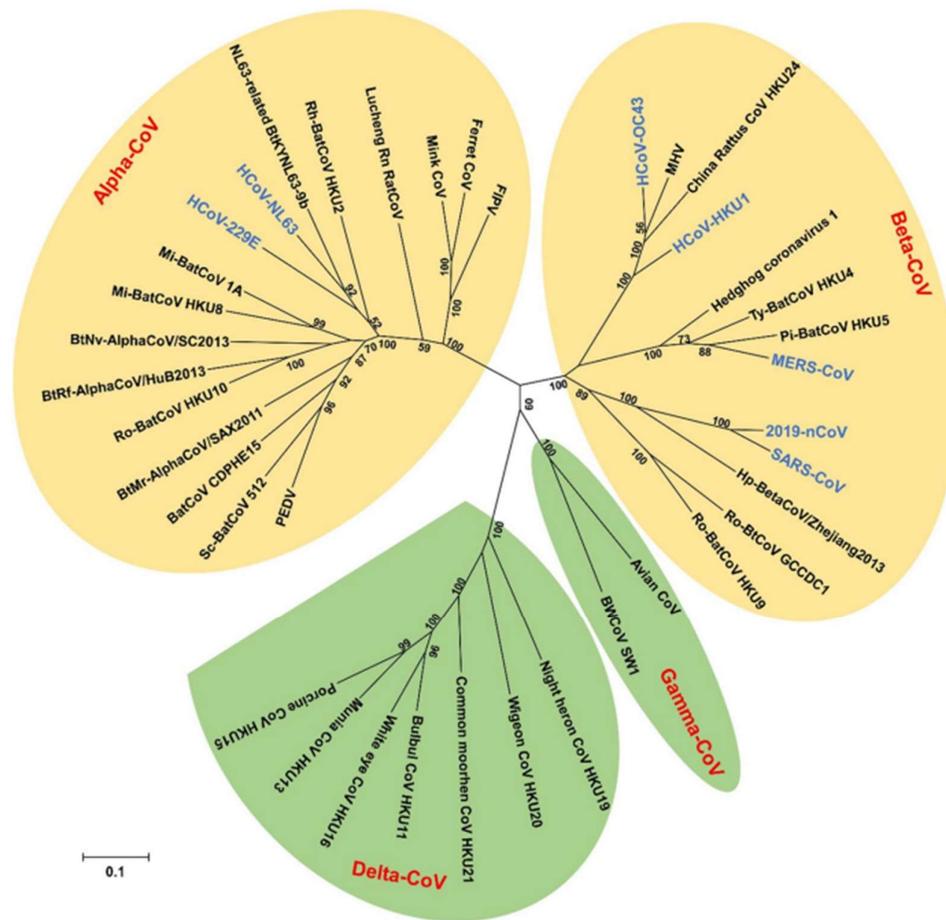


Figura 1. Árvore filogenética dos coronavírus baseada nas sequências de nucleotídeos da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Os quatro principais agrupamentos filogenéticos correspondem aos gêneros alfa-CoV, beta-CoV, gama-CoV e delta-CoV. Cada gênero de CoV contém diferentes subgêneros. As letras em azul indicam os coronavírus responsáveis por infecções respiratórias em humanos. Adaptado de Mollarasouli, Zare-Shehneh e Ghaedi (2022).

As infecções por coronavírus ocorrem predominantemente por via aérea, por meio da inalação de gotículas respiratórias ou aerossóis contendo o vírus e afetam principalmente o trato respiratório superior e inferior (Jayaweera *et al.*, 2020). Essas infecções podem resultar em doenças respiratórias, que em alguns casos, podem causar um quadro de pneumonia potencialmente fatal em indivíduos de diferentes idades principalmente recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos ou com comorbidades (Otieno *et al.*, 2022).

Os coronavírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 são agentes causadores de infecções respiratórias, que podem variar de leves a graves, com quadros de pneumonia e,

em casos mais severos, evolução para a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), caracterizados por alta morbidade e mortalidade (Shao et al., 2022). A infecção por MERS-CoV apresenta uma taxa de letalidade em torno de 34,4 % e os sintomas mais comuns são febre, tosse, falta de ar e pneumonia. Enquanto a infecção por SARS-CoV possui uma taxa de letalidade de 9,5% e sintomas como febre, calafrios, dores no corpo e pneumonia. A infecção por SARS-CoV-2 é caracterizada por uma variedade de sintomas, incluindo febre, fadiga, tosse, perda de paladar ou olfato, pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Petrosillo *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020). Apesar da taxa de letalidade de SARS-CoV-2 estar em torno de 2-3% (OMS, 2023) e ser menor comparado aos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV, a pandemia de COVID-19 causada por esse vírus resultou em um número elevado de mortes devido a sua alta transmissibilidade, que ocorre mesmo antes do surgimento de sintomas, permitindo a infecção de um maior número de pessoas em um menor tempo (Xiao *et al.*, 2020).

1.1.2 Estrutura dos coronavírus e ciclo replicativo

Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples sentido positivo (+ssRNA), envelopados, cujo formato esférico e projeções em forma de espinhos em sua superfície se assemelham a uma coroa. Representam vírus de RNA que possuem um genoma incomumente grande de ~30 kb que se deve à presença de genes que codificam uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), além de diversos genes acessórios que codificam proteínas envolvidas na regulação da replicação e na modulação da resposta do hospedeiro (Malone *et al.*, 2022).

O vírus SARS-CoV-2, apresenta em sua estrutura proteínas estruturais principais: proteína spike (S), proteína de envelope (E), proteínas do nucleocapsídeo (N) e proteínas de membrana (M) (Jiang *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020). O nucleocapsídeo, composto pelo RNA genômico e pela proteína N, está envolvido por uma bicamada lipídica, na qual estão ancoradas proteínas de superfície, incluindo a proteína S (Wu *et al.*, 2020) (Figura 2 A). Além disso, o genoma de SARS-CoV-2 compreende duas regiões flanqueadoras não traduzidas (UTRs). Na extremidade 5', o fragmento apresenta cerca de 265 nucleotídeos e na extremidade 3' cerca de 358 nucleotídeos. Na extremidade 5', o RNA genômico contém duas fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF1a e ORF1b) que são traduzidos pelo ribossomo da célula hospedeira e codificam 16 proteínas não estruturais (Nsp1-16).

Na extremidade 3', o genoma codifica as quatro proteínas estruturais S, N, M e E e nove proteínas acessórias como ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b e 10 (Figura 2 B).

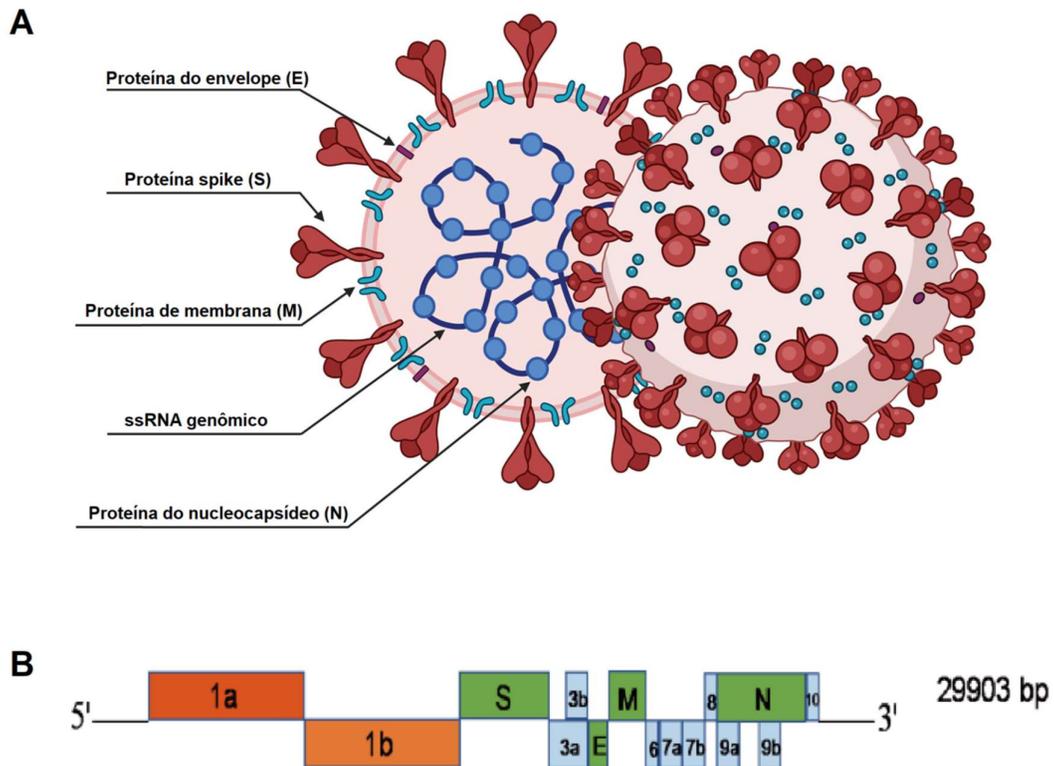


Figura 2. Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 e o seu genoma. (A) O virion contém um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) envolto por um envelope lipídico e por proteínas virais estruturais. A proteína do nucleocapsídeo (N) está associada ao genoma de RNA dentro das partículas do vírus. Outras proteínas são inseridas no envelope lipídico: os trimeros de pico (S), o envelope (E) e as proteínas de membrana (M). (B) 5' e 3' sequências terminais do genoma de SARS-CoV-2. A ordem dos genes é 5'-replicase ORF1ab-S-envelope(E)-membrana(M)-N-30. ORF3ab, ORF6, ORF7ab, ORF8, ORF9ab e ORF10 estão localizados nas posições mostradas na figura. 1a, 1b, 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b, 10 na imagem representam diferentes genes ORF. SARS-CoV-2 possui um genoma de RNA com um tamanho que varia de 29,9kb. Adaptado de Pizzato *et al.*, 2022 e Jin *et al.*, 2020.

No trato respiratório humano, o SARS-CoV-2 invade preferencialmente células epiteliais caliciformes produtoras de muco, células ciliadas e pode invadir as células endoteliais no pulmão por meio da ligação da proteína S do vírus com o receptor denominado de enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) juntamente com a protease de serina transmembranar 2 (TMPRSS2) (Pizzato *et al.*, 2022). A expressão e a distribuição tecidual dos receptores ECA2 influenciam no tropismo e na patogenicidade viral (V'kovski *et al.*,

2021). Além disso, o receptor ECA2 humano é altamente expresso nos alvéolos pulmonares, principalmente em células epiteliais alveolares do tipo II dos pulmões que constituem mais de 80% das células que expressam ECA2 (Zhao *et al.*, 2020). Entretanto, o receptor ECA2 também está presente em outros tecidos, como coração, cérebro, trato gastrointestinal, rins, vesícula biliar, esôfago, testículos, células endoteliais de artérias e veias, em células musculares lisas arteriais e na córnea e na conjuntiva (Hong *et al.*, 2020; Sungnak *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020; Lee; Sewa; Phua, 2020).

A proteína spike de SARS-CoV-2, além do receptor ECA2 humano (hECA2), também reconhece o ECA2 de outros hospedeiros como porcos, furões, macaco *Rhesus*, gatos, pangolins, coelhos e cachorros (Zhou *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2020; Chandrashekar *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

O ciclo replicativo inicia quando a proteína S localizada na superfície do vírion, se liga ao receptor ECA2 juntamente com a serina protease TMPRSS2, e sofre clivagem em subunidades S1 e S2. A subunidade S1, dividida em domínio de ligação ao receptor (RBD) que é fundamental na patogênese da infecção e domínio N-terminal (NTD), que permitem a entrada viral por meio da ligação da proteína spike ao receptor ECA2 da célula hospedeira seguida por importantes mudanças conformacionais necessárias para atingir a infecção. A subunidade S2, contendo um peptídeo de fusão, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático é responsável pela fusão da membrana vírus-célula (Jiang *et al.*, 2020). A ativação da subunidade S2 da proteína S depende da clivagem pela TMPRSS2, uma protease da célula hospedeira. Essa clivagem facilita a fusão da membrana viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus (Malone *et al.*, 2022). Além disso, o SARS-CoV-2 também pode entrar nas células por endocitose, utilizando a via endossomal, onde a clivagem e ativação da proteína spike dependem de proteases como a catepsina L (Hoffmann *et al.*, 2020; Tay *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

O vírus libera seu RNA genômico (gRNA) no citosol que é inicialmente traduzido para produzir as poliproteínas de replicase viral pp1a e pp1ab. As proteínas não estruturais virais nsp3 e nsp5 atuam como proteases e clivam pp1a e pp1ab em 16 proteínas não estruturais, que se organizam em complexos de replicação-transcrição (RTCs). A síntese de novos gRNA quando dos mRNAs subgenômicos (sg-mRNAs) ocorre dentro dos RTCs (Malone *et al.*, 2022). Os sg-mRNAs incluem quadros de leitura abertos (ORFs) de 2 a 9b, os quais codificam as proteínas estruturais S, M, E e N, além de várias proteínas acessórias. Os gRNAs recém-sintetizados podem ser traduzidos para gerar proteínas não estruturais

adicionais, servir como um molde para mais síntese de RNA ou ser empacotados em novos vírions. A montagem do SARS-CoV-2 começa com o revestimento dos gRNAs com proteínas do nucleocapsídeo, gerando estruturas nucleocapsídicas que brotam para o compartimento intermediário do retículo endoplasmático–Golgi (ERGIC), adquirindo assim uma bicamada lipídica contendo as proteínas S, membrana e envelope virais. As partículas virais recém-montadas são então liberadas das células infectadas por exocitose clássica ou por lisossomos desacidificados (Chan *et al.*, 2020; Pizzato *et al.*, 2022) (Figura 3).

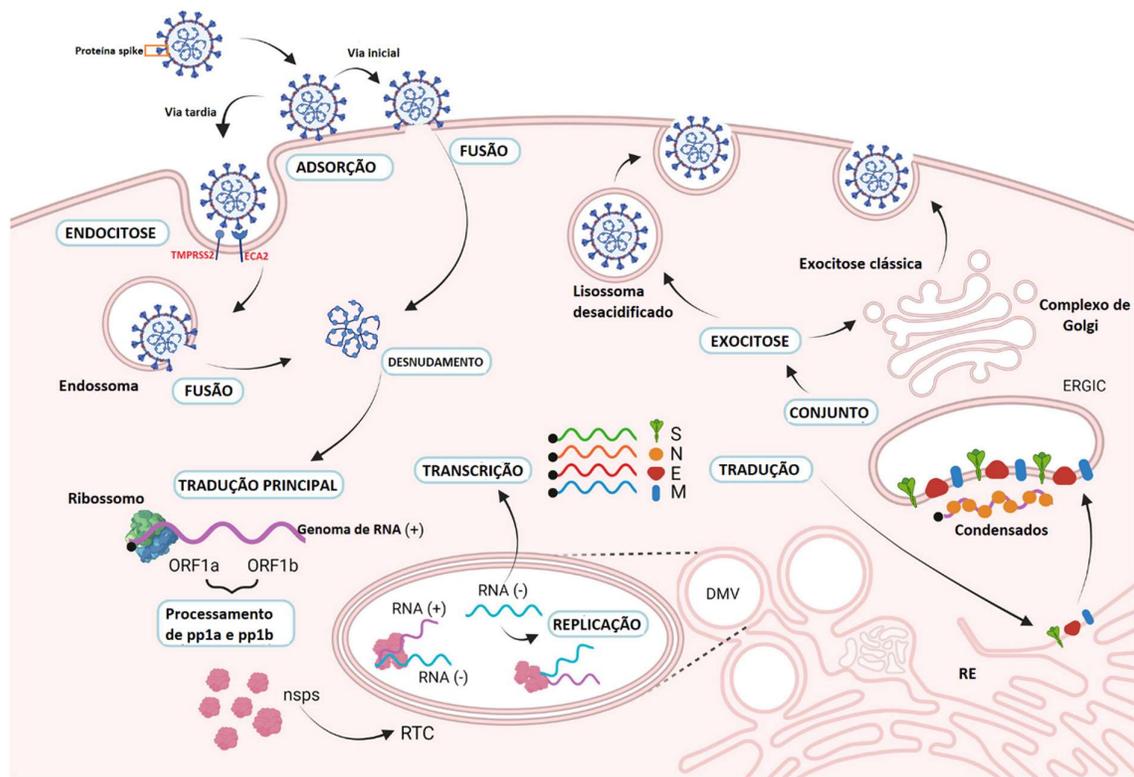


Figura 3. O ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2. O vírus interage com receptores celulares, como a enzima hACE2 e com proteases do hospedeiro que ativam as proteínas spike. A entrada no citoplasma da célula pode ocorrer de duas maneiras: a partícula viral é endocitada antes de se fundir com a membrana endossomal (via tardia), ou a membrana viral se funde com a membrana celular na superfície celular (via inicial). Dois grandes fases de leitura aberta, ORF1a e ORF1b, são imediatamente traduzidos nas poliproteínas pp1a e pp1b, que são processadas nas proteínas não estruturais individuais (Nsps) que formam o complexo de replicação e transcrição viral (RTC). A replicação do RNA genômico viral ocorre em vesículas protetoras de dupla membrana (DMVs). A transcrição e tradução do molde negativo resultam na formação de proteínas estruturais que são inseridas na membrana do retículo endoplasmático (RE) e transitam através do RE para compartimento intermediário de Golgi (ERGIC). Os condensados de RNA genômico recém-produzido e proteínas N interagem com proteínas E e M, resultando na montagem de partículas virais, que brotam no lúmen dos compartimentos vesiculares secretores. Os vírions são secretados de duas maneiras da célula infectada por exocitose: pela via clássica de exocitose via compartimento de Golgi ou pela incorporação em lisossomos desacidificados que se fundem com a membrana da superfície celular. Adaptado de Pizzato *et al.*, 2022.

A proteína Spike (S) induz robustas respostas imunológicas, tanto celulares quanto humorais. Ao estimular a produção de anticorpos neutralizantes, que bloqueiam a entrada do vírus nas células hospedeiras, ela desempenha um papel fundamental na prevenção da infecção viral. Devido a essa capacidade de gerar respostas imunoprotetoras, a proteína S tem sido amplamente utilizada como alvo para o desenvolvimento de vacinas contra o SARS-CoV-2 (Delgado *et al.*, 2022).

1.1.3 Coronavírus murino como modelo para estudo da SARS

Dadas as opções de modelos animais para estudar SARS-CoV-2, como por exemplo, camundongos transgênicos que expressam ECA2 humano (hECA2) como o modelo experimental K18-hACE2, hamsters, furões e primatas não humanos (Bao *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2021), o uso de outros betacoronavírus, como o *Murine hepatitis virus* (MHV), atualmente denominado *Betacoronavirus muris*, e o SARS-CoV, que compartilham do mesmo gênero com o vírus SARS-CoV-2, tem sido uma estratégia eficiente para desvendar muitos dos aspectos da infecção por coronavírus humano como tropismo, patogênese, virulência e resposta imune (Körner *et al.*, 2020).

O vírus MHV pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* e gênero *Betacoronavirus* e contém uma sequência genômica de RNA fita simples de sentido positivo, envelopado, com aproximadamente 25 a 31 kb (Artika e Dewantari, 2020). Esses vírus são patógenos naturais de camundongos (*Mus musculus*), e foram isolados pela primeira vez por Cheever em 1949. Dentro dessa espécie viral, existem várias linhagens, classificadas em dois grupos principais: as mais virulentas, como MHV-2, MHV-3, MHV-A59 e MHV-JHM, e as menos virulentas, como MHV-1, MHV-S, MHV-Y e MHV-Nu (Körner *et al.*, 2020).

Como ocorre com outros membros da família dos coronavírus, a infecção pelas linhagens de MHV diferem no organotropismo, virulência e patogenicidade (Körner *et al.*, 2020). As linhagens de MHV são classificadas como grupos respiratórios trópicos ou enterotrópicos com base na distribuição da infecção primária nos tecidos (Weiss e Leibowitz, 2011). Em linhagens politrópicas, que possuem um tropismo primário tanto para o trato respiratório superior quanto para a mucosa entérica, há necrose leve do epitélio nasal, pneumonia, formação de sincícios no baço, nódulos linfáticos, placas de Peyer, timo, fígado e medula óssea, encefalite necrotizante com desmielinização após disseminação hematogênica para o sistema nervoso central (SNC) (Brayton *et al.*, 2007; Weiss e

Leibowitz, 2011). Enquanto as linhagens enterotrópicas são amplamente restritas ao intestino e podem se espalhar para o fígado, tecido linfóide e baço (Körner *et al.*, 2020).

Diferente de outros coronavírus, incluindo SARS-CoV-2, a entrada do vírus MHV é dependente da interação da proteína S do envelope viral com seu receptor celular, a molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1 (CEACAM1) (Shang *et al.*, 2020). CEACAM1 é um membro da superfamília de imunoglobulinas envolvido em muitos aspectos patológicos e fisiológicos, como por exemplo, adesão, inflamação, tumorigênese e regulação fisiológica da remodelação óssea (Heckt *et al.*, 2014). CEACAM1 é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares como células do epitélio respiratório, células endoteliais e células hematopoiéticas mieloides, neurônios, neutrófilos e monócitos (Götz *et al.*, 2023). Após a entrada, a replicação dos vírus MHV ocorre no citoplasma da célula hospedeira usando uma RNA polimerase dependente de RNA que é traduzida a partir do RNA genômico (Körner *et al.*, 2020).

MHV é o coronavírus animal que induz uma variedade de condições em camundongos, incluindo infecções respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (Weiss e Leibowitz, 2011). Embora existam algumas diferenças entre o MHV e o SARS-CoV-2, os vírus MHV compartilham algumas semelhanças e podem servir como modelos alternativos para investigar os mecanismos patogênicos do SARS-CoV-2. Além disso, algumas linhagens de MHV induzem uma doença pulmonar semelhante à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (Körner *et al.*, 2020) (Figura 4).

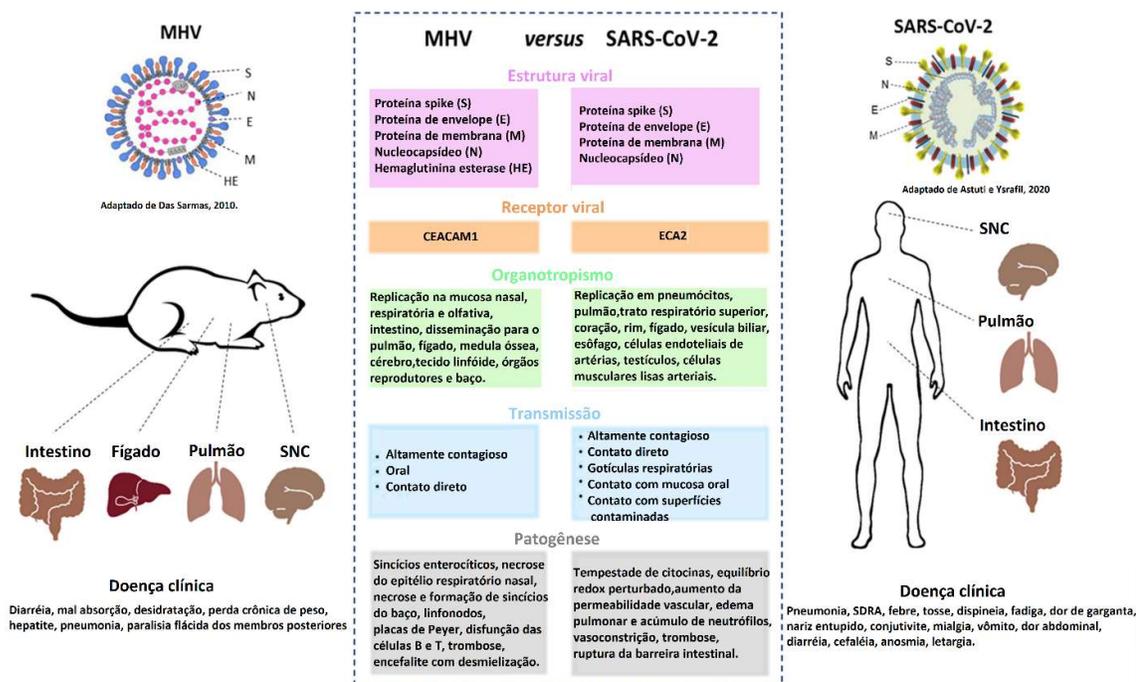


Figura 4. Diferenças entre os vírus MHV e SARS-CoV-2. Resumo das principais semelhanças e diferenças entre os coronavírus MHV e os coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Adaptado de Körner *et al.*, 2020.

O vírus MHV pertence ao mesmo gênero que o SARS-CoV-2, e a utilização de modelos de camundongos infectados com MHV poderia, por meio de uma abordagem translacional, proporcionar uma compreensão mais ampla da biologia e patogênese do SARS-CoV-2. Uma das vantagens de usar os coronavírus MHV como modelo é que os experimentos requerem apenas contenção de nível 2 de biossegurança, em oposição à contenção de nível 3 de biossegurança ao trabalhar com SARS-CoV e SARS-CoV-2 (Körner *et al.*, 2020).

A resposta pulmonar em camundongos à infecção pelo MHV varia conforme a linhagem viral e a linhagem do camundongo hospedeiro (Will *et al.*, 2019). A inoculação intranasal de camundongos BALB/c com variantes de MHV, como MHV-3, MHV-A59, MHV-1, MHV-S e MHV-JHM, demonstrou diferentes respostas de patogenicidade entre as linhagens de vírus (Khanolkar *et al.*, 2009; Leibowitz *et al.*, 2010). O MHV-1, conhecido por sua pneumovirulência, induziu uma doença pulmonar severa no sétimo e oitavo dia após infecção. Os pulmões dos animais infectados com MHV-1 apresentaram lesão alveolar difusa, caracterizada por infiltrado inflamatório composto predominantemente por células mononucleares, migração de leucócitos para os espaços alveolares e hemorragia intra-

alveolar com extravasamento de eritrócitos e edema intersticial. Esses achados histopatológicos são comparáveis aos danos observados em pulmões de pacientes humanos com infecção por SARS-CoV-2, destacando o MHV-1 como um modelo relevante para o estudo de infecções virais respiratórias e suas manifestações inflamatórias (Paidas *et al.*, 2021).

O vírus da hepatite murina A59 (MHV-A59) consegue infectar o pulmão de camundongos e induzir uma infecção pulmonar, semelhante a SDRA causada por SARS-CoV e MERS-CoV em pulmões humanos, portanto, pode beneficiar estudos adicionais da patogênese da infecção por coronavírus no trato respiratório humano (Yang *et al.*, 2014). Além disso, o vírus MHV-A59 tem sido amplamente utilizado como modelo experimental crônico para investigar as sequelas de longo prazo associadas à infecção por betacoronavírus, incluindo aquelas observadas na COVID-19 longa (Pimenta *et al.*, 2024).

O vírus MHV-3 representa uma linhagem politrópica, com tropismo tanto pulmonar quanto hepático, sendo um modelo experimental que permite investigar mecanismos de patogenicidade viral que envolvem tanto complicações respiratórias quanto hepáticas, simulando aspectos importantes de infecções virais sistêmicas. Além disso, o vírus se replica em macrófagos, aumentando o número de macrófagos peritoneais e citotoxicidade em macrófagos (Körner *et al.*, 2020).

Um estudo publicado por Andrade e colaboradores (2021), demonstrou que camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) infectados por via intranasal com MHV-3, recapitula muitos aspectos relacionados a infecção grave por SARS-CoV-2 em humanos, incluindo pneumonia, disfunção respiratória e inflamação associada a danos pulmonares. Após a manifestação respiratória, a infecção por MHV-3 se tornou sistêmica e uma alta carga viral foi detectada em múltiplos órgãos. Foi observado durante a infecção o aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF, refletindo assim algumas características clínicas observadas em casos moderados e graves de COVID-19. Além disso, o bloqueio de TNF por meio de abordagens genéticas ou farmacológicas preveniu as alterações respiratórias e sistêmicas desencadeadas pela infecção por MHV-3. Portanto, o estudo demonstrou que a infecção de camundongos com o vírus MHV-3 é um modelo seguro que reproduz a SARS em laboratório NB-2.

1.1.4 Patogênese da COVID-19

Indivíduos de todas as idades correm o risco de contrair a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e podem desenvolver a forma mais grave da COVID-19. No entanto, alguns fatores de risco clínicos podem contribuir para um mau prognóstico associado ao COVID-19, incluindo idade avançada (>65 anos) e presença de comorbidades subjacentes (Deng e Peng, 2020; Yang *et al.*, 2020). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2024), diferentes condições médicas podem favorecer a desfechos grave ou fatal associado a COVID-19, dentre eles indivíduos com obesidade, asma e outras doenças pulmonares crônicas, diabetes do tipo 2, condições cardíacas graves, doenças renais crônicas, doenças hepáticas, imunocomprometidos, hipertensão e malignidades.

Na COVID-19 é observado uma ampla gama de estados clínicos, desde sintomas leves e inespecíficos, casos assintomáticos, até doenças moderadas a graves que exigem hospitalização. E essas diferentes manifestações clínicas estão diretamente associadas às respostas iniciais do sistema imunológico inato ao SARS-CoV-2, que desempenham um papel essencial na contenção da infecção (Dai *et al.*, 2024). À medida que o SARS-CoV-2 infecta uma célula e inicia seu processo de replicação, o RNA viral é detectado por uma série de Receptores de Reconhecimento de Padrões celulares (RRP's), incluindo os receptores do tipo RIG-I, receptores do tipo NOD e receptores do tipo Toll (TLRs), que formam sistemas de vigilância imunológica especializados na detecção de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) relacionados a vírus ou outros patógenos (Sievers *et al.*, 2024). As proteínas estruturais e o +ssRNA de SARS-CoV-2 são reconhecidos como PAMPs e podem ser detectados pelos TLRs, induzindo a produção de citocinas antivirais e inflamatórias (Dai *et al.*, 2022).

A proteína S é um potente PAMP viral que é reconhecido por TLR2 em macrófagos, monócitos e células epiteliais pulmonares (Khan *et al.*, 2021). Após o reconhecimento, TLR2 forma heterodímeros com TLR1 ou TLR6, resultando na formação de um complexo que contém MyD88 e membros da família de quinases IRAK, ativando a via de sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e da quinase ativada por mitógeno (MAPK), levando à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (Khan *et al.*, 2021). Estudos também mostraram que TLR4 possui uma capacidade muito forte de se ligar à proteína S do SARS-CoV-2 (Choudhury e Mukherjee, 2020; Zhao *et al.*, 2021). Além do reconhecimento pelos receptores TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 localizados nas membranas celulares, outros receptores localizados na superfície do endossomo são responsáveis pelo reconhecimento

dos intermediários de replicação de ssRNA ou dsRNA do SARS-CoV-2, incluindo TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (Dai *et al.*, 2024)

Assim como muitos vírus, o SARS-CoV-2 é capaz de evadir o sistema imunológico inato por meio de várias estratégias, incluindo antagonismo viral, evasão de detecção e modulação da resposta inflamatória (Dai *et al.*, 2024). Dessa forma, SARS-CoV-2 consegue escapar das defesas antivirais do hospedeiro nas células infectadas e evitar a detecção de seu material patogênico por células adjacentes, resultando em uma replicação mais eficiente e contribuindo para a gravidade da infecção (Minkoff e tenOever, 2023). A produção de interferon do tipo I e III (IFN-I e IFN-III), assim como a indução de genes estimulados por interferons (ISGs), representam uma das linhas de defesa do hospedeiro que é comprometida durante a infecção por SARS-CoV-2. Isso ocorre devido à expressão de várias proteínas virais que interferem nessas vias, incluindo as Nsp1, Nsp3, Nsp5, Nsp6, Nsp13, Nsp14, Nsp15, ORF3b, ORF6, ORF7, ORF8 e proteína N (Shemesh *et al.*, 2021; Vazquez *et al.*, 2021), resultando na indução tardia de IFN-I e IFN-III nos pulmões ou no sangue periférico de indivíduos infectados com SARS-CoV-2 (Galani *et al.*, 2021). A proteína Nsp1 atua como um antagonista da sinalização do interferon ao suprimir a tradução de mRNAs relacionados à resposta antiviral do hospedeiro, enquanto Nsp13 reduz a sinalização dos promotores de interferon e NF- κ B ao limitar a ativação de TBK1 e IRF3 (Vazquez *et al.*, 2021). Um estudo demonstrou que fragmentos da proteína N, produzidos após clivagem pela caspase 6 do hospedeiro, podem atenuar a resposta de interferons do hospedeiro, o que reforça as evidências de que a proteína N é uma das proteínas virais que atua como antagonista de interferons. Esse tipo de interferência viral pela proteína N poderia resultar em um atraso na ativação da imunidade inata, o que facilitaria a replicação de SARS-CoV-2 e disseminação do vírus (CHU *et al.*, 2022).

A liberação de IFN-I, juntamente com várias outras moléculas inflamatórias após a ativação de PRRs, inicia defesas antivirais que envolvem a participação de células do sistema imunológico, na tentativa de limitar a replicação e disseminação viral (Minkoff e tenOever, 2023). No entanto, tanto o sistema imunológico inato quanto o adaptativo experimentam desregulação na COVID-19. Paradoxalmente, o sistema imunológico pode falhar em montar uma resposta antiviral eficaz, ao mesmo tempo em que induz uma inflamação potencialmente prejudicial, observada na COVID-19 grave (Davitt *et al.*, 2022).

Outro fator complicador na COVID-19 grave é redução de células dendríticas plasmocitoides (CDPs) que são células essenciais para a resposta imune inata pois,

reconhecem o RNA viral através do receptor endossomal TLR7 e produzem IFNs do tipo I e tipo III como resposta antiviral. No entanto, no início da COVID-19 é observado uma diminuição significativa de CDPs circulantes que é acompanhada pela falha em desencadear uma resposta antiviral inicial robusta através da produção de IFN tipo I (Van der Sluis *et al.*, 2022). Essa diminuição de CDPs na COVID-19 grave está relacionada ao aumento nos marcadores apoptóticos como a caspase 3 nessas células em decorrência dos altos níveis de citocinas como IL-6 e TNF que contribuem para inflamação sistêmica e (Zhu *et al.*, 2022).

A sinalização mediada por PRR's pode levar a ativação de células do sistema imune, incluindo células NK (natural killers) que auxiliam na depuração do vírus. No entanto, estudos têm demonstrado a atividade citotóxica das células NK na COVID-19 grave e identificaram uma relação inversa entre carga viral e atividade das células NK (Krämer *et al.*, 2021; Witkowski *et al.*, 2021). Além disso, comparado aos casos leves de COVID-19, pacientes com COVID-19 grave apresentam citopenia de células NK acompanhado de uma produção reduzida de IFN- γ e TNF que pode contribuir para o quadro de desregulação imunológica, devido a incapacidade de gerar uma resposta antiviral adequada na COVID-19 (Davitt *et al.*, 2022).

Os monócitos e macrófagos são células imunológicas cruciais no combate ao vírus, limitando a atividade do patógeno. No entanto, em alguns casos, podem favorecer a disseminação da infecção viral no hospedeiro (Meidaninikjeh *et al.*, 2021). O perfil imunológico de monócitos e macrófagos na COVID-19 é multifacetado. De fato, uma resposta inflamatória hiperativada e desregulada mediada por monócitos e macrófagos ao SARS-CoV-2 é considerada um dos principais fatores que contribuem para a gravidade da doença e a morte de pacientes com COVID-19 (Mohandas *et al.*, 2023).

Embora as contagens sanguíneas de monócitos e macrófagos em pacientes com COVID-19 permaneçam dentro da faixa de referência, a proporção de células ativadas entre eles é dramaticamente elevada (Huang *et al.*, 2021). Esses macrófagos ativados produzem altos níveis de IL-6 na COVID-19, uma citocina com efeitos variados em diferentes células do sistema imune, incluindo neutrófilos e linfócitos (Davitt *et al.*, 2022). Os níveis elevados de IL-6 induzem a ação inflamatória dos neutrófilos pela ativação da sinalização da via STAT3 (Antonioli *et al.*, 2020).

O aumento anormal do número de neutrófilos no sangue periférico, conhecido como neutrofilia, tem sido descrito como um indicador de doença grave e prognóstico desfavorável em pacientes com COVID-19 (Rong *et al.*, 2024). À medida que a doença progride para um

estágio grave, foi observado os neutrófilos em pacientes com COVID-19 estão significativamente hiperativados e que a razão neutrófilo-linfócito (RNL) se encontra aumentada (Sarkar, Khanna, Singh, 2022). Além disso, a hiperativação dos neutrófilos tem contribuído para danos ao tecido pulmonar e a liberação aumentada das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) contribuindo para formação de microtrombos pela associação com fatores de coagulação do sangue e plaquetas (Obermayer *et al.*, 2021), bem como para a inflamação exacerbada na COVID-19 (Gustine e Jones, 2021). Além da neutrofilia, outra característica observada durante a COVID-19 é a atraso na resposta pela população de linfócitos e o quadro de linfopenia que está associado a uma maior susceptibilidade às infecções secundárias em pacientes hospitalizados com COVID-19 (Davitt *et al.*, 2022; Rong *et al.*, 2024).

Uma das evidências para a redução da população de linfócitos T é a presença de neutrófilos estimulados por IL-6 que podem induzir ao aumento da expressão do ligante de morte celular programada 1 (PD-1) e levar a apoptose desses linfócitos (Davitt *et al.*, 2022). Além disso, em pacientes com COVID-19 foi observado que as contagens de células T são inversamente proporcionais às concentrações de IL-6, IL-10 e TNF, e essas células expressam níveis elevados de PD-1. Essas citocinas e vias de sinalização foram identificadas como possíveis mecanismos para a exaustão imunológica e desregulação observadas na COVID-19 (Diao *et al.*, 2020).

1.1.5 Obesidade como um fator de risco na COVID-19

A obesidade, antes da pandemia de COVID-19, já representava um problema de saúde pública global (OMS, 2024). O período de lockdown instaurado durante a pandemia para aliviar a sobrecarga no sistema de saúde e reduzir a propagação do vírus SARS-CoV-2 mudou abruptamente o estilo de vida e os hábitos alimentares, o que aumentou ainda mais a prevalência da obesidade no mundo (Nour e Altıntaş, 2023). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2024), os grupos com maior risco de doenças graves incluem, além da obesidade, asma e outras doenças pulmonares crônicas, diabetes do tipo 2, condições cardíacas graves, doenças renais crônicas, idade de 65 anos ou mais, imunocomprometidos e pacientes com doenças hepáticas. Muitas dessas condições clínicas são comuns entre os pacientes de alto risco e frequentemente estão associadas ou são consequências da obesidade, como diabetes, condições cardíacas e doenças respiratórias crônicas (Petrakis *et al.*, 2020).

Em geral, a obesidade é caracterizada por uma diminuição na complacência pulmonar devido ao acúmulo de gordura ao redor das costelas, diafragma e abdômen. Essa redução da complacência do sistema respiratório impacta a fisiologia respiratória devido ao aumento da resistência das vias aéreas e do trabalho respiratório, ineficiência dos músculos respiratórios e desigualdade de ventilação (Mafort *et al.*, 2016). Diante de insultos pulmonares leves como gripes ou exposição a baixos níveis de oxigênio, essas condições tornam o sistema respiratório já comprometido dos indivíduos obesos severamente afetado por qualquer dano pulmonar. Portanto, esses pacientes podem ter dificuldade para se recuperar se desenvolverem doenças graves que possam impactar negativamente a função respiratória, como a COVID-19 (Albashir, 2020).

Outro fator relacionado à obesidade que pode contribuir para os resultados adversos na COVID-19 é o aumento da atividade do sistema renina-angiotensina e aldosterona (SRAA) e da resistência à insulina (Bornstein *et al.*, 2020). O vírus SARS-CoV-2 infecta os pneumócitos do tipo II por meio da ligação direta com o receptor ECA2 (Lamers e Haagmans, 2022) que está relacionado com a regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Como a obesidade está associada à resistência à insulina e à hiperatividade do sistema SRAA, está implicada em piores prognósticos de COVID-19 (Bornstein *et al.*, 2020). ECA2 é responsável pela conversão da angiotensina em seus metabólitos, incluindo angiotensina (1-9) e angiotensina (1-7). A angiotensina (1-7) ativa os receptores MAS, que possuem efeitos anti-inflamatórios e vasodilatadores e, portanto, podem ser um regulador chave da SARS (Scholz *et al.*, 2020). Nos pulmões, a diminuição da angiotensina 1-7 e da ligação do receptor MAS acoplado à proteína G levam a danos pulmonares devido ao aumento da vasoconstrição, fibrose, inflamação, trombose, incluindo edema e permeabilidade desencadeados pela hiperatividade local da angiotensina II sem a ação benéfica da angiotensina 1-7 (Petraski, 2020).

A expressão de ECA2 no tecido adiposo de pacientes com obesidade e diabetes é maior do que no pulmão (Li *et al.*, 2020; Beyerstedt; Casaro e Rangel, 2021), um dos principais órgãos-alvo afetados pela COVID-19 e, portanto, permite a entrada do vírus nos adipócitos, tornando o tecido adiposo um importante reservatório viral que contribuiu para a disseminação da infecção para outros órgãos (Kruglikov e Scherer, 2020). De modo interessante, a expressão do ECA2 no tecido adiposo em modelos animais de obesidade induzida por dieta também é regulada positivamente em comparação aos animais em dieta controle (Gupte *et al.*, 2008).

O tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino chave (Starling, 2023), que secreta uma variedade de fatores, como adipocinas, quimiocinas e citocinas, que podem impactar negativamente o metabolismo e o sistema imunológico no contexto da obesidade (Mohammad *et al.*, 2021). Em indivíduos saudáveis, o tecido adiposo é composto por macrófagos M2, células T auxiliares (Th2), células T reguladoras (Treg) que são importantes para a manutenção do equilíbrio entre o ambiente pró-inflamatório e anti-inflamatório (Taylor, 2021). Além disso, os macrófagos com perfil M2 produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4, IL-13, e IL-1R α . Entretanto, na obesidade ocorre a alteração na quantidade de células imunológicas do tecido adiposo, reduzindo a população de células Th2, Treg e macrófagos M2 (Mohammad *et al.*, 2021), aumentando a abundância de células dendríticas (DCs), células Th1 e Th17 CD4+, linfócitos T citotóxicos CD8+ e macrófagos M1 (Taylor, 2021) (Figura 5).

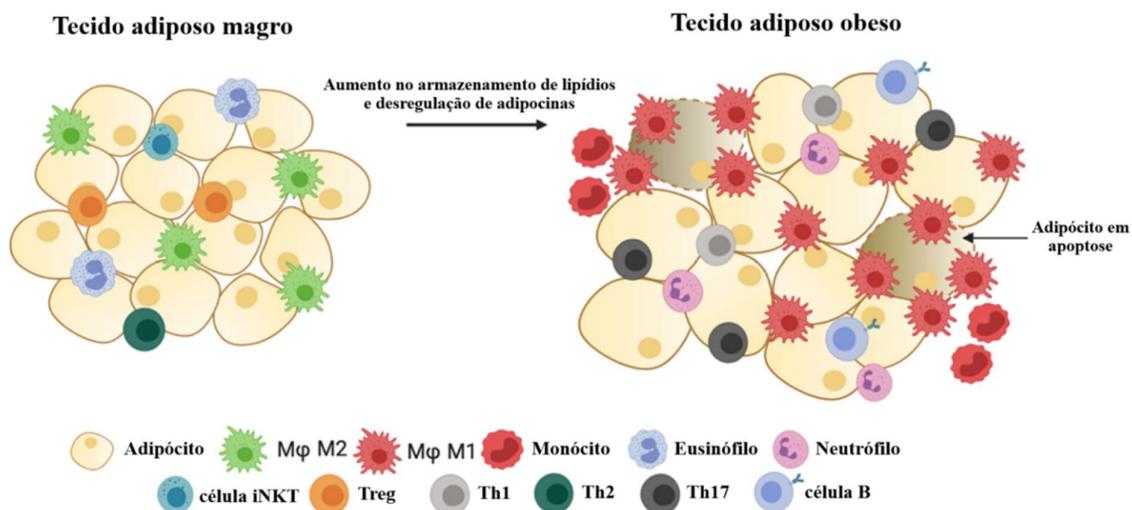


Figura 5. Alteração na população de células imunológicas em resposta à obesidade no tecido adiposo. O tecido adiposo magro é dominado por macrófagos M2 ativados alternativamente, células Th2, células T reguladoras (Tregs), células iNKT e eosinófilos, enquanto o tecido adiposo obeso apresenta um aumento no influxo de monócitos, macrófagos M1 pró-inflamatórios, células Th1, células Th17, neutrófilos e células B. Adaptado de Taylor, 2021.

No tecido adiposo saudável, os adipócitos liberam mediadores anti-inflamatórios como as adipocinas adiponectina, adipsina e omentina e citocinas IL-10 e IL-4. No entanto, durante a obesidade há uma mudança no repertório de mediadores produzidos pelos adipócitos, com a liberação de adipocinas pró-inflamatórias como leptina, resistina, visfatina, quemerina e citocinas como TNF, IL-6, MCP-1 (Taylor, 2021) (Figura 6).

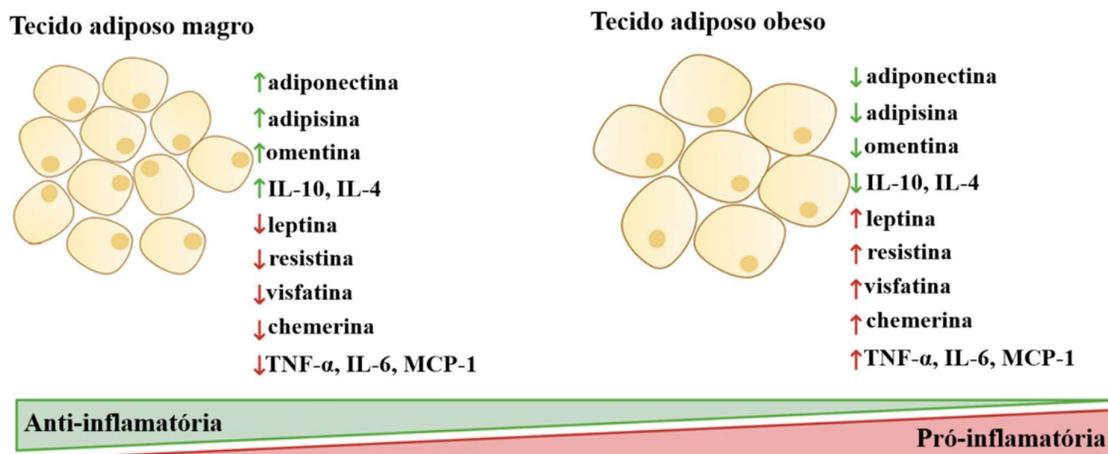


Figura 6. Alteração na produção de adipocinas, citocinas e quimiocinas no tecido adiposo magro e tecido adiposo obeso. No tecido adiposo magro é observado a liberação de mediadores anti-inflamatórios como adiponectina, adipisina, omentina e citocinas IL-10, IL-4 e uma liberação menor de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, durante a obesidade é observado um estado inflamatório com a liberação de mediadores pró-inflamatórios como leptina, resistina, visfatina e chemerina, e citocinas TNF, quimiocina MCP-1 e liberação reduzida de adipocinas e citocinas anti-inflamatórias. Adaptado de Taylor *et al.*, 2021.

A adiponectina, uma adipocina que apresenta atividade anti-inflamatória, contribui para o controle da captação de glicose e do metabolismo dos lipídios, reduzindo a gliconeogênese e aumentando a glicólise e a oxidação de ácidos graxos no fígado (Khoramipour *et al.*, 2021). Esses efeitos metabólicos ocorrem por meio de interações com os receptores AdipoR1 e AdipoR2 dos hepáticos que acionam as vias de sinalização de AMPK e PPAR- α , respectivamente (Mandal *et al.*, 2010). Além disso, a adiponectina ao ativar AMPK, estimula a translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) para a membrana, aumentando a captação de glicose nos músculos e a sensibilidade à insulina (Begum *et al.*, 2023). A adiponectina é um sensibilizador endógeno da insulina nos órgãos-alvo, incluindo o músculo esquelético e o fígado (Khoramipour *et al.*, 2021). A injeção de adiponectina recombinante em camundongos resulta em diminuição da glicose sanguínea e reverte a resistência à insulina em modelos de obesidade em camundongos (Taylor, 2021). No contexto de obesidade, os níveis da adiponectina é inversamente proporcional ao ganho de peso, o que explica a redução dos níveis de adiponectina em indivíduos obesos (Khoramipour *et al.*, 2021; Taylor, 2021).

A leptina, uma adipocina com atividade pró-inflamatória, que exerce diferentes funções no organismo como a regulação da ingestão de alimentos, massa corporal,

funcionamento reprodutivo e desempenhando um papel vital no crescimento fetal, nas respostas imunes pró-inflamatórias, angiogênese e na lipólise (Obradovic *et al.*, 2021). Embora a obesidade esteja associada a níveis elevados de leptina circulante em proporção ao aumento da massa de gordura, pacientes obesos geralmente são resistentes aos efeitos da leptina (Taylor, 2021). Esse aumento da quantidade de gordura corporal pode resultar em níveis elevados de leptina, e a exposição prolongada a esses níveis pode levar à resistência dessa adipocina, resultando na dessensibilização dos receptores de leptina no hipotálamo, onde ela exerce seus efeitos na regulação da saciedade (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020; Obradovic *et al.*, 2021). Além disso, a leptina está implicada na regulação de diferentes marcadores inflamatórios, incluindo TNF e IL-6 que podem reduzir a sinalização da insulina e moléculas sensibilizadoras da insulina (Barrios *et al.*, 2022). No entanto, a hiperleptinemia e a resistência à leptina foram associadas à resistência à insulina na obesidade, pois podem contribuir para um estado inflamatório crônico que compromete a sinalização da insulina (Kumar *et al.*, 2020).

Em indivíduos com obesidade, há uma rápida expansão do tecido adiposo devido ao excesso de ingestão calórica e/ou à redução do gasto energético resultando na hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, o que gera condições de hipóxia devido a uma vascularização inadequada, e morte por apoptose ou necrose dos adipócitos. A morte dos adipócitos aumenta a secreção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e adipocinas, levando a uma infiltração intensa de células imunológicas (Mohammad *et al.*, 2021; Hameed *et al.*, 2022). Além disso, esses adipócitos liberam quimioatraentes como a quimiocina CCL2 que promove o aumento do infiltrado de monócitos e outras células do sistema imune inato e adaptativo para o tecido adiposo (Petrakis, 2020). Essa liberação de CCL2 pelos adipócitos leva a diferenciação de monócitos do sangue em macrófagos com o perfil M1 que migram para o tecido adiposo e são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF, IL-1 β e quimiocina CCL2 (Yau, Wu e Qiu, 2022).

O tecido adiposo obeso e inflamado é composto por mais de 40% de macrófagos M1, que são uma fonte de citocinas pró-inflamatórias (Mohammad *et al.*, 2021). A infecção de macrófagos residentes no tecido adiposo e a inflamação resultante podem ser uma explicação mecanística para a associação epidemiológica entre obesidade e a gravidade da doença COVID-19 (Martínez-Colón *et al.*, 2022). Além dos macrófagos, os neutrófilos, células dendríticas e mastócitos, também contribuem para a inflamação, liberando vários fatores pró-inflamatórios que contribuem para um estado de inflamação crônica, tanto a nível

local quanto sistêmico (Mohammad *et al.*, 2021). A disfunção de células do sistema imune e a liberação aumentada de adipocinas, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo em indivíduos com obesidade podem contribuir para a inflamação sistêmica e gravidade da COVID-19 (Petraskis, 2020; Albashir, 2020; Mohammad *et al.*, 2021; Taylor, 2021; Yao, Wu e Qiu, 2022).

1.1.6 Tratamento e prevenção na COVID-19

Durante a pandemia de COVID-19, surgiram diferentes estratégias para o tratamento das diferentes formas da doença. Diversos agentes foram investigados, como cloroquina, hidroxicloroquina, favipiravir, terapias com anticorpos monoclonais e policlonais neutralizantes, RNA antisense, corticosteroides, plasma convalescente, inibidores de tirosina quinase e vacinas (Graviatopoulos *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2023). Além disso, a *Food and Drug Administration* (FDA) emitiu autorizações de uso emergencial para vários novos medicamentos e produtos médicos sem a aprovação completa da FDA (Yuan *et al.*, 2023).

A comunidade científica mundial trabalhou arduamente para o desenvolvimento de vacinas em tempo hábil. Graças aos esforços dessa comunidade, temos disponível diferentes vacinas contra a COVID-19 que foram aprovadas pela OMS, incluindo AstraZeneca/Oxford, Pfizer/BioNTech, Janssen, Moderna, Sinopharm, Sinovac, Bharat, Novavax, Casino, Valneva e CoronaVac, uma vacina do Instituto Butantan produzida no Brasil em parceria com a biofarmacêutica chinesa Sinovac (Paixão *et al.*, 2022; OPAS, 2024). As vacinas salvaram e continuam salvando a vida de milhões de pessoas, ao impedir o desenvolvimento das formas graves da COVID-19. No entanto, é necessário ressaltar que nenhuma das vacinas disponíveis apresenta cobertura vacinal de 100% (OMS, 2021). Outro fator complicador é que, durante a pandemia, muitas pessoas se recusaram a adotar a vacinação como um método de prevenção, o que reforça a necessidade pela busca de novas alternativas terapêuticas (Lui e Guaraldi, 2023).

Dentre os principais tratamentos disponíveis para tratamento da COVID-19 estão disponíveis medicamentos antivirais (Remdesivir, Molnupiravir e Nirmatrelvir-Ritonavir), imunomoduladores (Corticosteroide; tocilizumabe [inibidor de interleucina-6]; baricitinibe [inibidor de Janus quinase]; anti-inflamatórios não esteroideais (AINE's), anticorpos neutralizantes e terapias celulares e gênicas (Bartoletti *et al.*, 2022; Lui e Guaraldi, 2023). Entretanto, o uso de alguns antivirais tem demonstrado efeitos adversos. O uso antivirais orais foram associados a efeitos adversos como sintomas gastrointestinais e a disgeusia com

o uso de nirmatrelvir-ritonavir, enquanto o remdesivir apresentou maior risco de bradicardia (Tiseo *et al.*, 2023; Schulz *et al.*, 2024). Estudos demonstraram que 12–20% das populações de risco com doenças subjacentes durante a COVID-19 apresentaram interações medicamentosas graves ou precisaram alterar tratamentos crônicos ao serem tratados com nirmatrelvir-ritonavir (Lim *et al.*, 2022; Larsen *et al.*, 2022).

O uso de tocilizumabe em pacientes idosos durante a COVID-19 foi relacionado a efeitos adversos como o aumento do risco de infecções virais e bacterianas, elevação dos níveis de AST ou ALT, arritmias e complicações trombóticas (Wang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2020). Além disso, foram observados efeitos adversos com o uso de corticosteroides em pacientes com COVID-19, incluindo o atraso na eliminação viral, infecções por fungos oportunistas, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hiperglicemia (Van Paasen *et al.*, 2020). Portanto, o uso de determinados tratamentos atualmente disponíveis para a COVID-19 é limitado quando se trata de indivíduos imunocomprometidas, idade avançada ou com comorbidades pré-existentes devido aos efeitos adversos, representando uma parcela significativa da população mundial que precisa de tratamento personalizado quanto à escolha, combinação e duração dos tratamentos (Zhou *et al.*, 2022; Lui e Guaraldi, 2023).

1.1.7 Reposicionamento de drogas e fármacos

Durante a pandemia, o reposicionamento de drogas e fármacos ganhou reconhecimento como uma abordagem alternativa para explorar novos usos para medicamentos pré-existentes comercialmente aprovados e/ou drogas com atividade antiviral e anti-inflamatória para o tratamento adjuvante da COVID-19 (Serafin *et al.*, 2020; Chakraborty *et al.*, 2021; Brummelen e Brummelen, 2022). Desse modo, o reposicionamento de drogas ou medicamentos resulta em menores despesas gerais de desenvolvimento e avaliações de risco, pois a eficácia e a segurança já foram avaliadas e aprovadas pelas autoridades reguladoras, de modo que supera os desafios tradicionais de descoberta de novos medicamentos que é um processo complexo, caro e demorado (Low, Farouk e Lal, 2020).

As doenças causadas por coronavírus podem levar a uma desregulação da resposta imune do hospedeiro, resultando em uma inflamação persistente e inadequada, que está relacionada a uma ampla gama de processos patológicos (Gomez-Escobar *et al.*, 2021). Dessa forma, a identificação de drogas ou fármacos capazes de interferir na replicação viral e reduzir a inflamação associada a infecção constitui uma área de intenso interesse (Mani,

Wadhvani e Krishnamurthy, 2019). Dentro dessa categoria estão incluídos os fármacos como atorvastatina, dasatinibe e o composto natural resveratrol.

Durante a pandemia, vários estudos sugeriram a investigação das propriedades farmacológicas e o potencial como tratamento adjuvante na COVID-19 das estatinas, incluindo a atorvastatina (Rodríguez-Diez *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; De Jesús-González *et al.*, 2024), dos inibidores de tirosina quinase como o dasatinibe (Weisberg *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023; Namasivayam *et al.*, 2022), e do nutracêutico resveratrol (Russo *et al.*, 2023; Brummelen e Brummelen, 2022).

1.1.8 ESTATINAS - ATORVASTATINA

As estatinas são fármacos hipolipemiantes usados no tratamento de dislipidemias, pois atuam como inibidores seletivos e competitivos da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, responsável pela conversão do substrato HMG-CoA em mevalonato, que é, por sua vez, convertido em colesterol. As estatinas têm um impacto significativo na redução do colesterol, pois a maior parte do colesterol plasmático circulante é originada da síntese endógena nos hepatócitos e não da dieta. Apesar disso, a ingestão dietética de colesterol pode exercer influência, embora em menor proporção, devido à regulação compensatória do metabolismo hepático (Morofuji *et al.*, 2022). Ao reduzir a síntese hepática de colesterol, ocorre uma regulação positiva dos receptores de LDL e um aumento na captação hepática de LDL-colesterol circulante (Figura 5) (Sirtori, 2014; Sizar *et al.*, 2024).

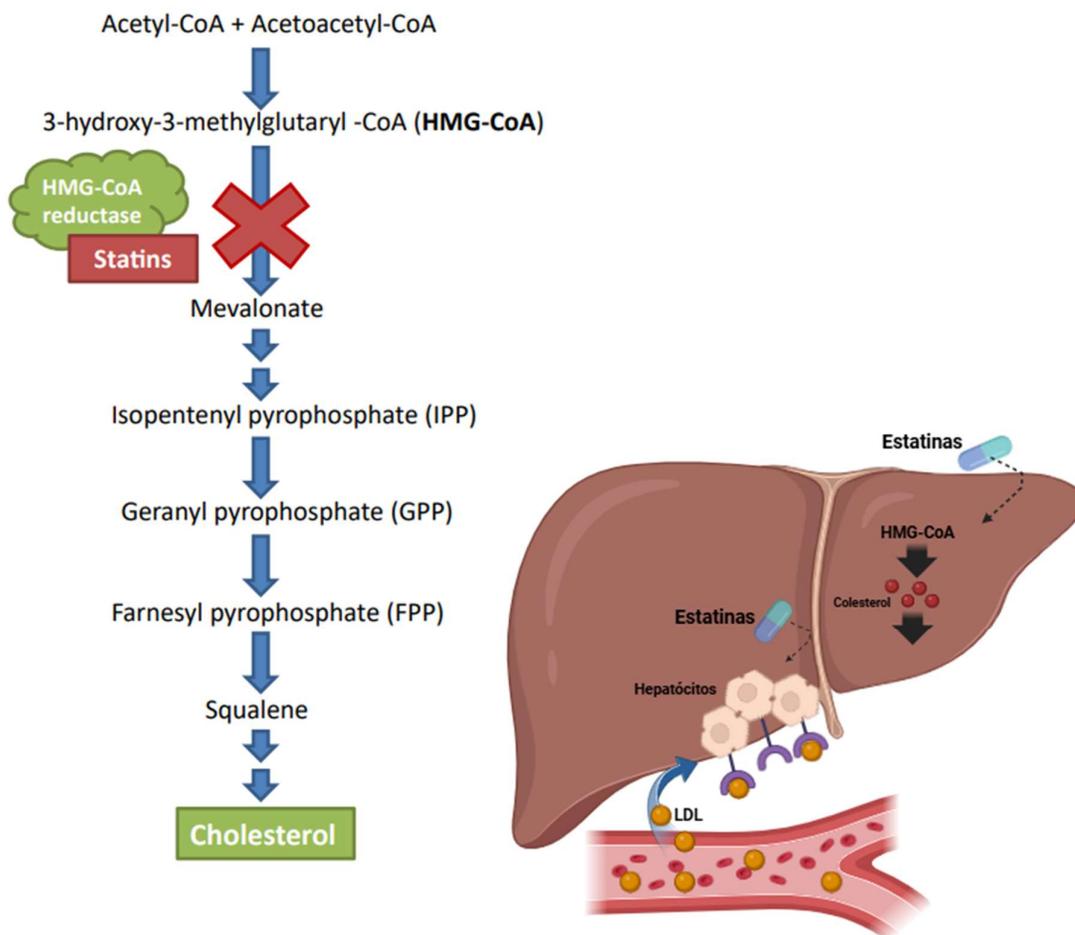


Figura 7. Mecanismo de ação das estatinas na biossíntese do colesterol. As estatinas inibem a enzima HMG-CoA reductase, responsável pela conversão de HMG-CoA em mevalonato, um precursor essencial na síntese do colesterol. A redução na produção de mevalonato diminui a formação de intermediários como pirofosfato de isopentenila (IPP), pirofosfato de geranila (GPP) e pirofosfato de farnesila (FPP), culminando na redução da produção hepática de colesterol. Além disso, a redução do colesterol intracelular nos hepatócitos estimula a expressão de receptores de LDL na superfície celular. Esses receptores aumentados captam mais LDL da circulação, diminuindo os níveis plasmáticos de colesterol LDL. Adaptado de Sirtori (2014).

As estatinas além de reduzirem as concentrações plasmáticas do colesterol total e LDL circulante, também atuam na redução dos níveis de VLDL, triglicérides, apo-B e aumentam as concentrações plasmáticas de HDL circulante (Bansal e Cassagnol, 2023). Esses fármacos atuam como inibidores competitivos, contendo um grupo hidroximetilglutaril (HMG) que se liga ao mesmo sítio enzimático do substrato HMG-CoA. Essa ligação impede o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima HMG-CoA reductase,

induzindo uma mudança conformacional que reduz sua atividade enzimática (Bansal e Cassagnol, 2023).

Dependendo de sua capacidade de se dissolver em água ou em meios contendo lipídios, as estatinas podem ser classificadas em hidrofílicas ou lipofílicas. Desse modo, podem ser predominantemente lipofílicas como é o caso da sinvastatina, fluvastatina, pitavastatina, lovastatina e atorvastatina que podem entrar facilmente nas células e apresentam uma menor seletividade às células hepáticas em relação às estatinas hidrofílicas como a rosuvastatina e pravastatina que possuem maior hepatosseletividade (Climent, Benaiges e Pedro-Botet, 2021). O fígado é o principal órgão-alvo das estatinas, visto que é nos hepatócitos onde ocorre o maior volume de síntese de colesterol. Apesar de se difundirem passivamente com mais facilidade pelas membranas dos hepatócitos, as estatinas lipofílicas também são capazes de se difundirem para outros tecidos com a mesma capacidade (Cedraz e Lavarato, 2020).

Estudos têm demonstrado que as estatinas como atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e simvastatina exercem efeitos além da diminuição do colesterol sérico, conhecidos como efeitos pleiotrópicos, que podem ser relevantes para o tratamento adjuvante da COVID-19. O tratamento com as estatinas têm demonstrado atividades anti-inflamatória, antioxidante, ação reguladora na função endotelial, diminuição da resposta trombogênica que podem se mostraram benéficas no tratamento de diferentes doenças do trato respiratório (Kim *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014; Badar *et al.*, 2014; De Paula *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2019; Minz, Bansal e Kasliwal, 2020; He *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2023), incluindo efeitos antivirais durante infecção por vírus respiratórios (Franco-Pelaéz *et al.*, 2021; Brett *et al.*, 2011; Fedson, 2013; Mehrbod *et al.*, 2014).

As estatinas além de reduzirem os níveis de colesterol, exercem efeitos anti-inflamatórios ao bloquearem a via do mevalonato. Esse bloqueio afeta metabólitos a jusante da via, como os farnesil pirofosfatos (FPP) e geranylgeranyl pirofosfatos (GGPP), que são cruciais para a prenilação e fixação de GTPases, como RhoA, Rac e Ras, à membrana celular. Essas GTPases atuam como moléculas sinalizadoras importantes na inflamação. Assim, os produtos da via do mevalonato desempenham papéis essenciais em diferentes etapas da resposta imune, incluindo ativação de células imunes, migração celular, produção de citocinas pró-inflamatórias, regulação do metabolismo imune e promoção da sobrevivência celular (Zeiser, 2018).

As estatinas também são conhecidas por seus efeitos contra o estresse oxidativo (Minz, Bansal e Kasliwal, 2020) e atividade antitrombótica (Davis *et al.*, 2023; Murthy *et al.*, 2023). Em conjunto, essas atividades podem ser benéficas para o tratamento auxiliar da COVID-19 já que a doença pode levar ao estresse oxidativo que contribui para a inflamação e ao desenvolvimento de coagulopatia e complicações tromboembólicas, como trombose venosa sistêmica e embolia pulmonar (Kunal *et al.*, 2020; Bastin *et al.*, 2023).

As estatinas também apresentam efeitos imunomoduladores sobre as células do sistema imunológico inato e adaptativo atuando na função de macrófagos, neutrófilos, células natural killer, enquanto influenciam o sistema imunológico adquirido ao inibir a apresentação de antígenos e a polarização de células T, que são mecanismos independentes da redução de colesterol (Koushki *et al.*, 2021). Em macrófagos, as estatinas exercem uma ação anti-inflamatória ao promover a polarização dessas células para o subtipo M2 além de regular a proliferação, fagocitose e eferocitose dos macrófagos em diferentes condições patológicas (Tajbakhsh *et al.*, 2022; Sheridan *et al.*, 2022; Sadeghi *et al.*, 2024). Um estudo mostrou que o tratamento com a sinvastatina reduziu a inflamação neutrofílica mediada por Th17 e a hiperreatividade das vias aéreas ao diminuir a expressão de PAD4 e inibir a NETose em um modelo murino de asma grave (Chen *et al.*, 2023).

Estudos têm demonstrado que as estatinas, principalmente a atorvastatina, podem desencadear a produção de mediadores pró-resolutivos especializados (SPM), que são moléculas endógenas derivadas de lipídeos originados de ácidos graxos poliinsaturados omega-6 e ômega-3, como o ácido araquidônico, ácido graxo docosahexaenoico e eicosapentaenoico, que desencadeiam e modulam a resolução da inflamação. Desse modo, os SPM podem levar ao aumento da fagocitose pelos macrófagos, diminuição da ativação e proliferação de linfócitos e diminuição da infiltração de neutrófilos, levando assim à resolução da inflamação em doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, infecções bacterianas ou virais (Palmas *et al.*, 2021; Welty *et al.*, 2021; Radbakhsh *et al.*, 2022)

As estatinas também podem influenciar na entrada viral nas células humanas já que conseguem afetar o conteúdo de colesterol das membranas celulares e interferir na ligação da proteína do coronavírus ao receptor da célula hospedeira pois, a ligação de SARS-CoV-2 aos receptores ECA2 presentes nas superfícies celulares é facilitada pela presença de balsas lipídicas nas membranas celulares. As balsas lipídicas também estão envolvidas nas fases de replicação viral, pois constituem pacotes de vesículas capazes de concentrar os fatores de replicação do vírus. Esses processos também são altamente desestabilizados pelas estatinas

(Glend *et al.*, 2008; Mehrbod *et al.*, 2014). Elas também regulam positivamente a expressão de receptores da ECA2 nas superfícies celulares, o que pode promover a entrada viral nas células, mas ao mesmo tempo, pode minimizar a lesão tecidual através da produção de angiotensina (1-7) (Fedson, 2013; Castiglione *et al.*, 2020) (Figura 6).

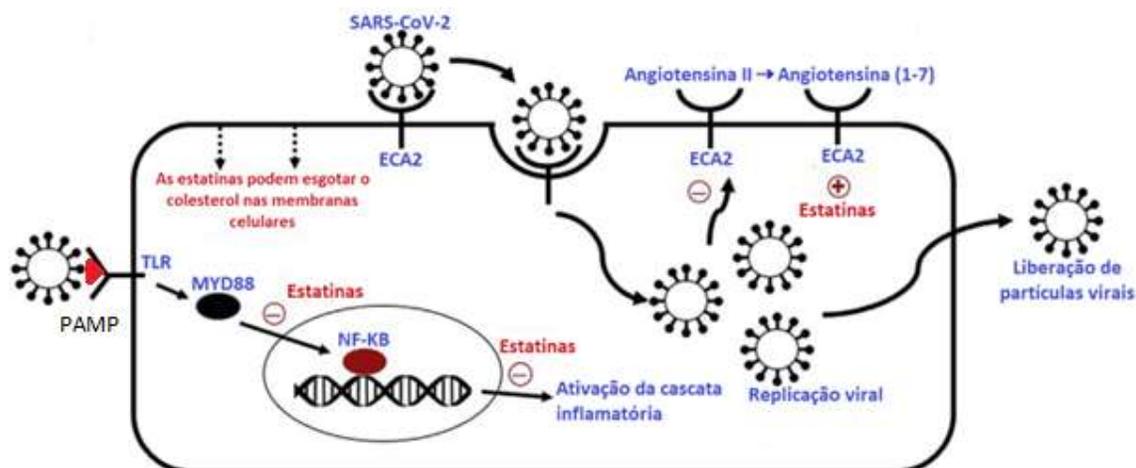


Figura 8. Mecanismos moleculares propostos envolvidos nos efeitos das estatinas na COVID-19. O vírus SARS-CoV-2 entra na célula ligando-se ao ECA2. Uma vez na célula, o SARS-CoV-2 causa regulação negativa do receptor ECA2, reduzindo assim seus efeitos protetores mediados pela conversão de angiotensina II em angiotensina (1-7). As estatinas regulam positivamente o ECA2. Os coronavírus também são conhecidos por induzir uma resposta pró-inflamatória do hospedeiro através da ativação da via TLR-MYD88-NF-κB, que é inibida pelas estatinas. As estatinas também podem reduzir a entrada viral ao esgotar o conteúdo de colesterol na membrana celular, mas esse mecanismo ainda não foi completamente esclarecido. Adaptado de Minz, Bansal e Kasliwal, 2020.

O efeito do tratamento com estatinas em infecções respiratórias tem sido demonstrado em várias pesquisas. Estudos com os vírus Influenza H1N1, H3N2, H5N1, Vírus Sincicial Humano e SARS-CoV têm demonstrado que as estatinas atuam diretamente diminuindo a replicação viral, a sinalização celular, produção de mediadores inflamatórios e melhorando a sobrevivência em modelos animais (Brett *et al.*, 2011; Fedson, 2013; Mehrbod *et al.*, 2014). Além disso, esses estudos demonstraram mecanismos potenciais antivirais desencadeados pelo tratamento com a atorvastatina. Foram observados que nas infecções com as linhagens do vírus influenza H3N2 e H1N1, o tratamento com a atorvastatina provocou a regulação negativa da via da quinase Rho/Rho, inibiu a replicação viral, reduziu a taxa de mortalidade dos animais infectados e tratados, com redução dos títulos virais e de mediadores inflamatórios (Mehrbod *et al.*, 2014).

Estudos retrospectivos observacionais, também demonstram o efeito protetor do uso de estatinas em pacientes internados com COVID-19. Os pacientes que faziam uso de estatinas tiveram um menor risco de desenvolver doenças graves, um tempo mais rápido de recuperação, uma menor mortalidade e melhores condições de recuperação, além de um menor número de intubações e de internações na UTI (Zhang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021; Kouhpeikar *et al.*, 2022). Portanto, esses estudos reforçam a necessidade de investigar os mecanismos pelos quais as estatinas exercem seus efeitos protetores no contexto da COVID-19.

1.1.9 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE - DASATINIBE

As quinases são enzimas responsáveis pela transferência de um grupo fosfato para uma proteína, enquanto as fosfatases removem o grupo fosfato dessa proteína. Esse processo enzimático modula diversas atividades das proteínas nas células, muitas vezes em resposta a um estímulo externo. Dessa forma, as quinases mantêm a função celular ativando as proteínas, enquanto as fosfatases reverterem essa ação (Bhullar *et al.*, 2018).

A função das quinases nas células é normalmente rigidamente regulada, sendo estas proteínas componentes chave nas modificações pós-traducionais, especialmente na fosforilação, que desempenha um papel crucial na regulação de vários processos celulares (Kumar *et al.*, 2024). A maioria das proteínas quinases promovem proliferação, sobrevivência e migração celular. No entanto, na ocorrência de mutações, desregulação ou superexpressão dessas quinases pode alterar significativamente a sinalização celular, promovendo a tumorigênese e outras condições patológicas humanas incluindo doenças imunológicas, neurológicas e infecciosas (Bhullar *et al.*, 2018).

Em razão de seu papel central em diversas patologias, muitos inibidores de tirosina quinase (ITQ) já receberam a aprovação pela FDA e tem sido utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer e provou ser bem-sucedido na terapia clínica de doenças malignas, como câncer de mama e de pulmão (Bhullar *et al.*, 2018). Desse modo, os inibidores de quinase simples (que inibem uma única quinase) e múltiplos (que têm como alvo várias quinases ao mesmo tempo), tanto sintéticos quanto naturais, são utilizados como estratégias terapêuticas direcionadas ao tratamento de malignidades humanas (Cohen *et al.*, 2021).

Embora originalmente desenvolvidos para o tratamento de diversos tipos de câncer, os inibidores de tirosina quinase (ITQs) podem representar uma solução potencial para o tratamento de doenças causadas por diferentes vírus, incluindo vírus respiratórios como o

SARS-CoV-2. Os ITQs apresentam diferentes atividades farmacológicas que podem ser benéficas para aliviar os sintomas graves e potencialmente fatais da COVID-19, incluindo atividades antiviral, anti-inflamatória e antifibrótica (Weisberg *et al.*, 2020) (Figura 7).

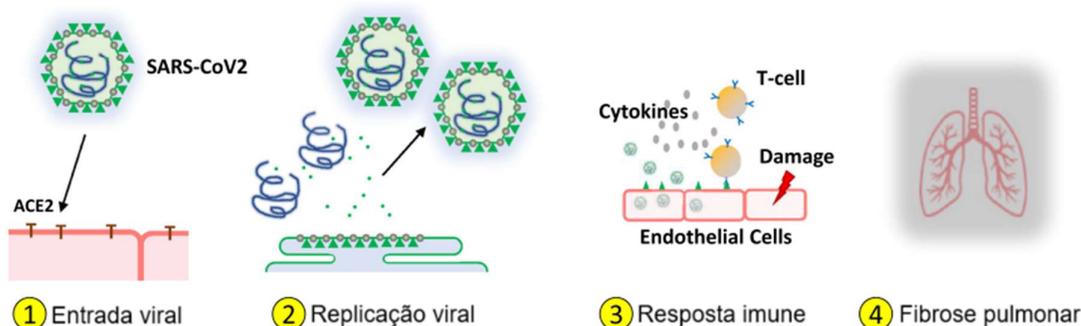


Figura 9. Reposicionamento de inibidores de tirosina quinase para tratamento terapêutico da COVID-19. (1-2) O uso de ITQ's pode interferir em proteínas-chave envolvidas nos processos de entrada e replicação viral do SARS-CoV-2. (3) Papel anti-inflamatório dos ITQ's ao reduzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios críticos para os danos pulmonares observados em pacientes com COVID-19. (4) Efeito antifibrótico dos ITQ's que podem ser benéficos no contexto da COVID-19. Adaptado de Weisberg *et al.*, 2020.

Esses medicamentos já foram amplamente avaliados pela FDA quanto à segurança e estão prontamente disponíveis para o tratamento de pacientes e para testes em ensaios clínicos relacionados à COVID-19 (Weisberg *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023; Namasivayam *et al.*, 2022). Além disso, os ITQ's podem ser testados em combinação com agentes antivirais ou outras terapias direcionadas, o que pode aumentar sua eficácia em comparação ao uso isolado. Nesse contexto, um inibidor de quinase com propriedades farmacocinéticas ideais poderia ser reaproveitado como uma terapêutica de dupla função, capaz de reduzir a infecção por meio de um efeito antiviral direto, além de proporcionar benefícios clínicos ao suprimir os sintomas da doença (Weisberg *et al.*, 2020).

Estudos com o dasatinibe e outros ITQs têm demonstrado resultados promissores, com efeitos antivirais destacados contra infecções causadas por diferentes vírus, como HIV, Dengue, Monkeypox, hepatite C e vírus respiratórios, como betacoronavírus, incluindo MERS-CoV e SARS-CoV (Reeves *et al.*, 2011; De Wispelaere, LaCroix e Yang, 2013; Dyall *et al.*, 2014; Coleman *et al.*, 2016; Min *et al.*, 2017; Sisk, Frieman e Machamer, 2018; Rodríguez-Mora *et al.*, 2024). No entanto, os mecanismos pelos quais os ITQ's, incluindo o dasatinibe, afetam a replicação viral ainda não são completamente compreendidos.

Clinicamente, o dasatinibe é usado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de próstata e alguns outros tumores sólidos (Yu *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2011). No entanto, tem demonstrado efeitos protetores em diferentes doenças, incluindo doenças respiratórias (Oliveira *et al.*, 2015; Ozanne, Prescott e Clark, 2015; Cruz *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2019).

Dasatinibe é um potente inibidor de tirosina quinase de segunda geração, de administração oral, que atua como um agente multialvo ao inibindo uma ampla variedade de tirosina quinases envolvidas na fisiopatologia de diversas neoplasias, principalmente a leucemia mieloide crônica (LMC). Além de inibir a proteína quimérica BCR-ABL, que é a principal responsável pela patogênese da LMC, dasatinibe atua como um inibidor de múltiplas tirosinas quinases, incluindo as quinases da família SRC (como SRC, LCK, HCK, FYN, YES, FGR, BLK, LYN e FRK), além de receptores tirosina quinases, incluindo c-KIT, o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) α e β , e os receptores de efrina, como EPHA2 (Montero *et al.*, 2011). O dasatinibe se liga de forma competitiva ao sítio de ligação do ATP no domínio catalítico da tirosina quinase, bloqueando o acesso ao ATP. Isso impede a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas-alvo, interferindo nas vias de sinalização a jusante. Enquanto na presença do ATP, a tirosina quinase transfere grupos fosfato para proteínas-alvo, ativando a mesma e permitindo a progressão dos sinais intracelulares (Lussana *et al.*, 2017).

As quinases da família SRC são quinases de tirosina não receptoras envolvidas na regulação de funções celulares importantes, como proliferação celular, diferenciação, apoptose, migração e metabolismo (Ortiz *et al.*, 2021). Essas quinases estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, incluindo membrana plasmática, endossomo e núcleo (Bagnato *et al.*, 2020) e estão associadas a diversos processos celulares, como transdução de sinais intracelulares e endossomais (Hikita *et al.*, 2019), rearranjo do citoesqueleto (Pant *et al.*, 2021) e regulação de proteínas nucleares (Bagnato *et al.*, 2020). No entanto, a desregulação ou ativação anormal das quinases da família SRC, que são alvos do ITQ dasatinibe, está relacionada à progressão tumoral, invasão e metástase em diversos tipos de câncer (Ortiz *et al.*, 2021).

O primeiro relato sobre tirosina quinase SRC e sua relação com vírus foi descrito em 1911 por Peyton Rous que descobriu um vírus que induzia sarcoma em galinhas e para isso, utilizava proteína v-Src (viral Src) como um oncogene, denominado Vírus do Sarcoma de

Rous (RSV) (Rous, 1911; Elemento, 2021). Estudos têm demonstrado o papel das quinases da família SRC durante a replicação de diferentes vírus (Kumar *et al.*, 2011; Nogalski *et al.*, 2013; Leite e Way, 2015; Ye *et al.*, 2017; Broeckel *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2024). Os vírus dependem completamente dos processos celulares, incluindo sinalização celular do hospedeiro e o metabolismo, para aumentar suas chances de sobrevivência, replicação e disseminação (Boulant *et al.*, 2015; Pant *et al.*, 2021). Para isso, podem explorar vias de sinalização do hospedeiro mediadas por tirosinas quinases, incluindo a via de SRC para facilitar sua entrada na célula hospedeira através do rearranjo do citoesqueleto de actina (Pant *et al.*, 2021). Além disso, a família SRC é responsável pela fosforilação de diferentes proteínas, um mecanismo chave que coordena uma variedade de respostas celulares, incluindo a inflamação (Bhanumathy *et al.*, 2021). A via de sinalização mediada por SRC pode levar a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), que, por sua vez, induzem a ativação de vias pró-inflamatórias, incluindo do NF- κ B (Pelaz *et al.*, 2022). Dessa forma, a via de sinalização mediada por SRC, alvo do dasatinibe, representa um potencial mecanismo terapêutico a ser explorado para reduzir tanto a resposta inflamatória quanto a replicação viral no contexto de infecções por coronavírus.

O dasatinibe, bem como outros ITQ's, tem demonstrado uma variedade de ações farmacológicas em diferentes doenças pulmonares que podem ser muito úteis no tratamento adjuvante da COVID-19. O fármaco dasatinibe tem demonstrado um potencial anti-inflamatório pois, consegue atenuar a expressão da via NF-KB e STAT3, que são vias relacionadas a com a respostas inflamatória, e conseqüentemente, reduz os níveis de citocinas TNF e IL-1 β que são mediadores da resposta inflamatória (Hassan *et al.*, 2021). Além disso, o dasatinibe demonstrou efeitos protetores contra SDRA. Um estudo mostrou que após 48 horas de indução de SDRA experimental, o tratamento com 1 mg/kg ou 10 mg/kg de dasatinibe melhorou a função pulmonar e reduziu a expressão do receptor TLR-4 no pulmão. Além disso, o tratamento com dasatinibe reduziu a migração de neutrófilos e os níveis da citocina IL-6 e TGF- β , e aumentou os níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Oliveira *et al.*, 2015). Em outro estudo, foi observado que o tratamento com dasatinibe levou a polarização dos macrófagos para fenótipo M2 e inibiu a inflamação e fibrose pulmonar (Cruz *et al.*, 2016).

Outra atividade relacionada ao dasatinibe é a antioxidante, pois promove a ativação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Xue *et al.*, 2012). O Nrf2 é um fator de transcrição que coordena a ativação basal e induzível por estresse de uma variedade

de genes citoprotetores, sendo considerado um regulador mestre da resposta antioxidante (Tonelli *et al.*, 2018). A ativação de Nrf2 confere efeitos protetores sobre várias doenças respiratórias, incluindo infecções respiratórias, displasia broncopulmonar, SDRA, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, câncer de pulmão e SDRA (Wei *et al.*, 2018). Um estudo demonstrou as atividades antioxidante e anti-inflamatória do tratamento com dasatinibe em modelo *in vitro* e *in vivo* SDRA induzido por LPS. Os ensaios *in vivo* revelaram que o tratamento com dasatinibe aumentou a expressão proteica da heme oxigenase 1 (HO1) e promoveu a polarização do subtipo M2 de macrófagos no estágio inicial da inflamação, por meio da ativação do Nrf2, sugerindo que a regulação do equilíbrio na polarização dos macrófagos pode ser uma nova forma de tratamento de SDRA. Além disso, o dasatinibe atenuou a lesão pulmonar com a inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias de IL-6 e TNF e aumentou a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 (Liu *et al.*, 2020).

O tratamento com dasatinibe tem demonstrado potencial antifibrótico, sendo sugerido como uma abordagem terapêutica para complicações fibróticas, como a fibrose pulmonar que pode ser observada pós-COVID-19 (Weisberg *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2022). Esse efeito é atribuído à capacidade do fármaco de promover a mudança de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório, caracterizado por alta produção de IL-10 e supressão de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF (Ozanne, Prescott e Clark, 2015; Guo *et al.*, 2019). Em um estudo de indução da silicose experimental aguda, o tratamento com o dasatinibe aliviou os danos pulmonares por meio da indução da polarização de macrófagos em direção ao fenótipo M2 e inibição da inflamação e fibrose no pulmão (Cruz *et al.*, 2016). Além disso, um estudo *in vitro* demonstrou que o tratamento com dasatinibe foi capaz de inibir a diferenciação de miofibroblastos induzida por TGF- β por meio do bloqueio da sinalização mediada por SRC (Abdalla *et al.*, 2015). Devido a essas funções, o tratamento com dasatinibe pode contribuir para a inibição do desenvolvimento da fibrose pulmonar observada na COVID-19, onde cerca de 44,9% dos sobreviventes de COVID-19 têm maior risco de desenvolver fibrose pulmonar e comprometimento funcional dos pulmões após a doença (Amin *et al.*, 2022).

Os ITQs, como o dasatinibe, têm se mostrado potenciais candidatos para reposicionamento terapêutico devido às suas atividades anti-inflamatórias e antivirais, que podem contribuir de forma significativa no tratamento adjuvante da COVID-19. Com base nesses estudos, levantamos a hipótese de que o tratamento com dasatinibe poderia exercer um efeito protetor durante a infecção por betacoronavírus. Para investigar essa possibilidade,

avaliamos o papel da ativação da tirosina quinase SRC, alvo de dasatinibe, durante a infecção pelo betacoronavírus MHV-3 em macrófagos murinos, além de explorar os possíveis mecanismos pelos quais o dasatinibe pode atuar como tratamento adjuvante em infecções causadas por coronavírus.

1.1.10 RESVERATROL

O resveratrol (3,5,4'-trihidróxi-trans-estilbeno) é um fitocomposto natural amplamente encontrado em sua forma de isômero trans em mais de 70 espécies de plantas, como japonês knotweed, em frutas, incluindo uvas e frutas vermelhas, amendoins, cacau, soja e em algumas plantas medicinais (Salehi *et al.*, 2018). Além de sua forma glicosilada, o resveratrol ocorre nos isômeros estruturais cis-resveratrol e trans-resveratrol, que exibem efeitos biológicos distintos. A radiação ultravioleta (UV) induz a conversão parcial do isômero trans em cis, sendo a forma trans-resveratrol mais estável e biologicamente ativa, enquanto a forma cis é menos estável e portanto, tem menor biodisponibilidade (Rigon *et al.*, 2019).

O resveratrol é uma fitoalexina produzida em resposta a diferentes condições de estresse, incluindo estresse biótico atuando na proteção das plantas contra infecções virais, bacterianas e fúngicas, e abiótico em condições climáticas adversas (De Sa Coutinho *et al.*, 2018). Além disso, é um composto polifenólico de baixo peso molecular (228,25 g/mol) que pertence à família dos estilbenoides, derivados hidroxilados do estilbeno com uma estrutura polifenólica C6-C2-C6 (Rigon *et al.*, 2019). O composto natural resveratrol apresenta características lipofílicas que o tornam facilmente absorvido, metabolizado pelo fígado e excretado, sendo utilizado como suplemento alimentar, embora tenha uma baixa biodisponibilidade (Pannu e Bhatnagar, 2019). Esse composto polifenólico pode entrar na célula por difusão passiva, endocitose mediada ou por proteínas transportadoras, ao se ligar a receptores específicos, como o receptor de membrana integrina $\alpha v \beta 3$ (Alesci *et al.*, 2022).

O uso do resveratrol como nutracêutico e agente terapêutico para uma variedade de doenças tem sido amplamente investigado, e diferentes atividades biológicas do resveratrol têm sido observadas em modelos animais e humanos, incluindo ensaios clínicos, no contexto de obesidade, síndrome metabólica (Fang *et al.*, 2017; Batista-Jorge *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Tshivhase, Matsha, Raghubeer, 2024), doenças cardíacas (Fang *et al.*, 2017; Esfandiarei *et al.*, 2019) e câncer (Najafiyani *et al.*, 2024). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado uma gama de atividades farmacológicas relacionadas com o uso de resveratrol

incluindo antioxidante, anti-inflamatória, propriedades antivirais em infecções por vírus respiratórios (Cheng *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2021), incluindo por betacoronavírus (Lin *et al.*, 2017; Filardo *et al.*, 2020). Além de sua atividade amplamente reconhecida como um potente antioxidante, o resveratrol é conhecido por seus efeitos pleiotrópicos, que incluem a modulação da expressão de genes envolvidos na inflamação, no metabolismo lipídico, na resposta ao estresse oxidativo contribuindo assim para sua ação protetora contra diversas doenças, incluindo como uma estratégia terapêutica para a COVID-19 no contexto de obesidade (Meng *et al.*, 2021; Brummelen e Brummelen, 2022; Batista-Jorge *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Diferentes estudos têm demonstrado a atividade antioxidante e anti-inflamatória do resveratrol. O tratamento com resveratrol reduziu o burst oxidativo em monócitos e granulócitos humanos após estímulo com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Além disso, o tratamento com resveratrol em RAW 264.7 inibiu a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e ciclooxigenase 2 (COX-2) em macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com LPS por 18 horas. Foi observado que o resveratrol induziu a translocação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), um regulador mestre da resposta antioxidante, e reduziu a expressão de *miR-146a*, um miRNA que está relacionado com a regulação negativa da imunidade inata e resposta inflamatória (Bigagli *et al.*, 2017). Em outro estudo, foi observado que o tratamento com resveratrol em células RAW 264.7 estimuladas com LPS e o IFN- γ reduziu os níveis das citocinas IL-1 β , TNF e IL-6. Além disso, foi observado que o resveratrol regula negativamente a via de sinalização TLR4/NF- κ B/fator induzível por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α) (Guo *et al.*, 2023). O resveratrol também pode modular negativamente a sinalização das vias pró-inflamatória mediadas HIF-1 α /PI3K/Akt/mTOR (Lee *et al.*, 2015), STAT3 (Baek *et al.*, 2016) e a hiperativação do inflamassoma NLRP3 (Zhang *et al.*, 2024).

O papel antiviral do resveratrol também tem sido demonstrado por diferentes estudos, incluindo em infecções por vírus respiratórios humanos (Filardo *et al.*, 2020; Velásquez *et al.*, 2024). O resveratrol mostrou atividade inibitória contra a replicação viral e inflamação induzida por vários vírus patogênicos humanos, incluindo vírus respiratórios como o vírus da gripe Influenza (H1N1) (Palamara *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2015), vírus sincicial respiratório (VSR) (Xie *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Zang *et al.*, 2015; Filardo *et al.*, 2020), rhinovírus humano (HRV) (Mastromarino *et al.*, 2015), metapneumovírus humano (hMPV) (Komaravelli *et al.*, 2015), e coronavírus humanos como MERS-CoV (Lin

et al., 2017) e SARS-CoV (Li *et al.*, 2006). Nesse contexto, tem sido observado que o tratamento com resveratrol apresenta atividade antiviral direta contra algumas espécies de vírus respiratórios ao interferir em etapas da replicação viral, bem como atividade indireta ao modular a resposta do hospedeiro para conter a infecção (Filardo *et al.*, 2020) (Figura 9).

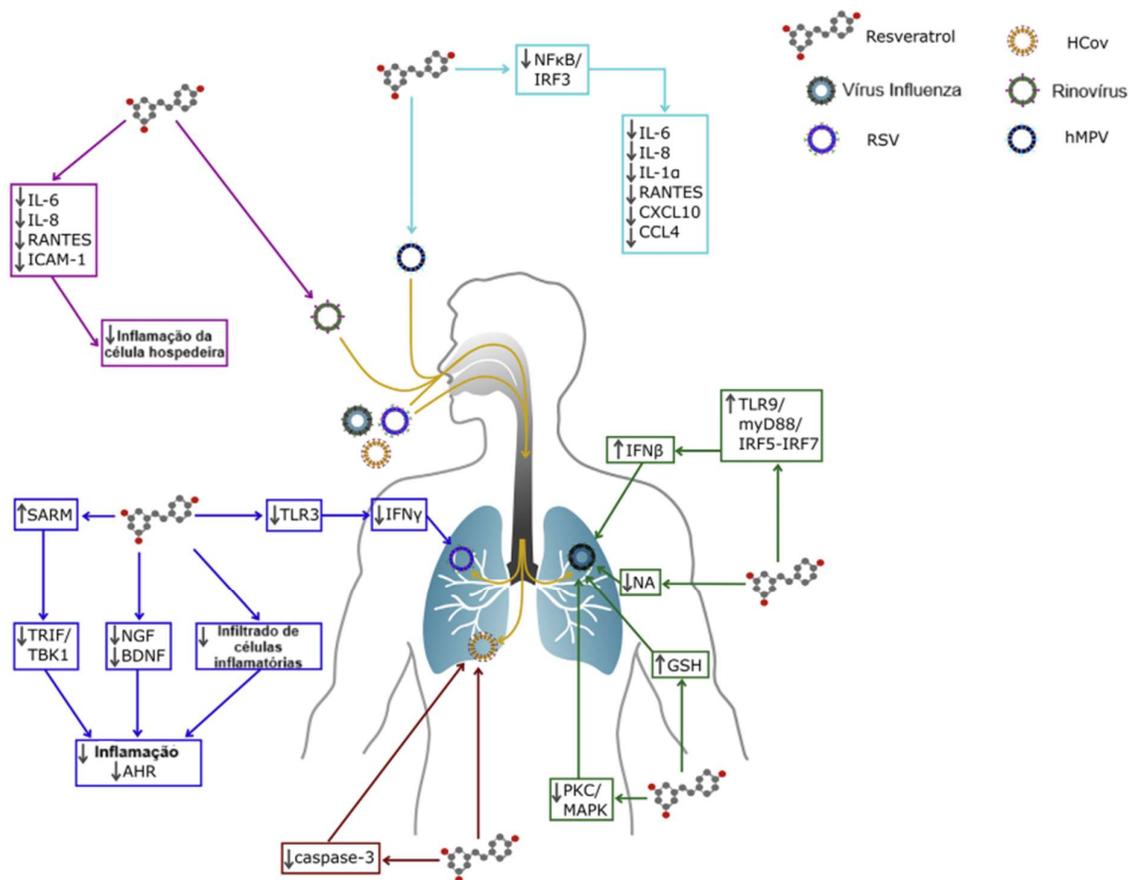


Figura 10. Efeitos terapêuticos do resveratrol em diferentes infecções por vírus respiratórios. Mecanismos anti-inflamatórios e antivirais do resveratrol contra os vírus Influenza, coronavírus humano (HCoV), vírus sincicial respiratório (RSV), rinovírus e metapneumovírus humano (hMPV). Adaptado de Filardo *et al.*, 2020.

O tratamento com o resveratrol durante a infecção pelo vírus influenza A (H1N1) na linhagem celular MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) resultou na diminuição da tradução de proteínas virais tardias e bloqueio da translocação nuclear citoplasmática de ribonucleoproteínas virais (RNPs). Esses efeitos foram mediados pela inibição de vias de sinalização intracelular, como a proteína quinase C (PKC) e MAPK (Palamara *et al.*, 2005). Enquanto na infecção pelo vírus RSV em células epiteliais, o tratamento com resveratrol promoveu a redução tanto da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 quanto da

replicação viral. Além disso, foi observado redução da expressão do domínio do receptor toll-like, induzido pelo vírus, e da proteína quinase 1 de ligação a TANK (TBK1) (Xie *et al.*, 2012).

O tratamento com resveratrol durante a infecção por rinovírus humano (HRV) reduziu a liberação das citocinas IL-6, IL-8 e CCL5 a níveis semelhantes aos observados no epitélio nasal não infectado e diminuiu drasticamente as proteínas virais estruturais do capsídeo, como a VP2 (Mastromarino *et al.*, 2015). A atividade antiviral de resveratrol também foi observada durante a infecção por betacoronavírus. Em um ensaio *in vitro* com células Vero E6 infectadas por MERS-CoV, o resveratrol reduziu a apoptose evidenciado pela diminuição dos níveis de caspase-3. Além disso, foi observado que o tratamento com resveratrol reduziu a expressão da proteína N, essencial para a replicação do MERS-CoV (Lin *et al.*, 2017). O resveratrol também demonstrou atividade antiviral ao reduzir a replicação do SARS-CoV em células Vero E6 (Li *et al.*, 2006).

Muitos estudos justificam o uso do resveratrol em doenças humanas, incluindo na COVID-19. O uso do Resveratrol tem sido proposto para o tratamento de pacientes com COVID-19, devido à sua atividade imunomoduladora e anti-inflamatória capaz de reduzir os altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-8, TNF, RANTES, CCL4, CXCL10 (Filardo *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020). Como um potente antioxidante, o resveratrol pode atuar na redução da inflamação ao modular vias relacionadas ao estresse oxidativo na COVID-19 (Giordo *et al.*, 2021).

O desequilíbrio redox é um dos fatores que contribui para a patogênese na COVID-19 (Manjumder *et al.*, 2020). A produção de ROS é marcadamente elevada em pacientes com COVID-19, sendo particularmente alta em pacientes em ventilação mecânica. Essa geração de ROS se correlaciona fortemente com a contagem de neutrófilos, uma vez que essas células são responsáveis produção por uma maior produção de ROS, seguida pelos macrófagos (Laforge *et al.*, 2020; Veenith *et al.*, 2022).

Outro papel importante do resveratrol é sua atuação no metabolismo, especialmente na regulação de parâmetros relacionados à obesidade e síndrome metabólica associada. Considerando que a obesidade é um fator de risco para a COVID-19, o resveratrol se destaca como uma alternativa terapêutica promissora (Brummelen e Brummelen, 2022; Batista-Jorge *et al.*, 2020).

Cada vez mais, estudos têm demonstrado uma gama de ações farmacológicas do resveratrol, reforçando seu potencial como agente terapêutico para o tratamento de diferentes

doenças, incluindo a COVID-19. Nesse sentido, a investigação do potencial do reposicionamento do resveratrol para tratamento adjuvante da infecção por coronavírus se torna uma estratégia promissora.

2. JUSTIFICATIVA

O reposicionamento de fármacos representa uma estratégia promissora para enfrentar infecções virais emergentes, como as causadas por coronavírus, devido à rapidez com que drogas já aprovadas podem ser avaliadas e aplicadas clinicamente. A COVID-19 destacou a necessidade de terapias adjuvantes capazes de modular a inflamação disfuncional e reduzir a replicação viral, especialmente em pacientes com fatores de risco, incluindo indivíduos com obesidade. A obesidade é caracterizada por um estado inflamatório crônico e distúrbios metabólicos associados, e esses indivíduos estão mais propensos a desenvolver formas graves de COVID-19 devido à tempestade de citocinas decorrente da infecção, que pode ser agravada pela inflamação sistêmica característica da obesidade. Considerando que as estatinas (atorvastatina), inibidores de tirosina quinases (dasatinibe) e o composto natural resveratrol possuem atividade anti-inflamatória e antiviral em modelos de infecções virais e que o controle do processo inflamatório disfuncional observado na COVID-19 é de extrema importância. Esse trabalho se justifica pela necessidade de caracterizar os efeitos anti-inflamatórios e antivirais desses fármacos, em modelos *in vitro* ou *in vivo* de infecção por betacoronavírus, inclusive sob a influência de comorbidade (obesidade induzida por dieta de cafeteria).

3. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos anti-inflamatórios e antivirais do tratamento com atorvastatina, dasatinibe e resveratrol em modelos de infecção por betacoronavírus, com o intuito de avaliar seu potencial terapêutico adjuvante na COVID-19.

3.1 Objetivos específicos

Capítulo 1 -Dasatinibe

- Padronização da infecção por MHV-3 na linhagem de celular de macrófagos murinos RAW 264.7.
- Analisar a citotoxicidade do dasatinibe e os efeitos do tratamento prévio na infecção por MHV-3 em macrófagos murinos.
- Avaliar os efeitos do tratamento pós-infecção com dasatinibe na infecção com MHV-3 em macrófagos murinos.
- Investigar o papel da tirosina quinase SRC e a via de sinalização a jusante mediada por MAPK-NF- κ B na infecção por MHV-3 na ausência ou presença do tratamento com dasatinibe.

Capítulo 2 - Atorvastatina

- Avaliar a citotoxicidade da atorvastatina e os efeitos do pré-tratamento na infecção por MHV-3 em macrófagos murinos.

Capítulo 3 -Resveratrol

- Padronização da infecção por MHV-A59 na linhagem de celular de macrófagos murinos RAW 264.7.
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento e do tratamento pós-infecção com resveratrol em macrófagos murinos na infecção com os vírus MHV-3 e MHV-A59.
- Reprodução do modelo murino de obesidade induzido por dieta de cafeteria durante infecção por MHV-A59.
- Avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre os parâmetros clínicos em animais com obesidade durante infecção com MHV-A59.
- Investigar se o tratamento com resveratrol pode reduzir os danos pulmonares, a carga viral e parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos em animais com obesidade durante infecção com MHV-A59.
- Avaliação da liberação de ROS por neutrófilos derivados da medula óssea (BMDN) de camundongos submetidos à dieta controle e à dieta de cafeteria, na infecção por MHV-A59 e tratamento com resveratrol.
- Investigar os efeitos do tratamento com resveratrol nos parâmetros inflamatórios relacionados ao tecido adiposo epididimal (tecido adiposo visceral) dos animais com obesidade durante a infecção por MHV-A59.

- Investigar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre os parâmetros pulmonares e metabólicos em modelos animais K18-hACE2 com obesidade durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de linhagens celulares e vírus

As linhagens celulares RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71) e L929 (ATCC[®] CCL-1), foram cultivadas em atmosfera controlada (37°C, 5% CO₂) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, Brasil), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µg/mL estreptomicina (Gibco). O vírus da hepatite murina amostra MHV-3 foi cedida e sequenciada (acesso GenBank no. MW620427.1) por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil) (Garcia *et al.*, 2021), e propagada em células L929. A amostra do vírus da hepatite murina A59 (MHV-A59) ATCC (ATCC VR-764 – disponível em <https://www.atcc.org/products/all/VR-764.aspx>) foi adquirido, e propagado em células L929 (ATCC, CCL1) para geração dos estoques virais. Além disso, o vírus SARS-CoV-2 (Wuhan Hu-1 amostra SP02BRA) foi gentilmente concedido pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon (GenBank número de acesso MT350282) e utilizado em experimentos *in vivo* que foram realizados em contingenciamento NB3 no Laboratório de Nível de Biossegurança 3 – NB3 - ICB UFMG.

4.2 Tratamentos com atorvastatina, dasatinibe e resveratrol *in vitro*

Para definir as concentrações ideais de tratamentos com as drogas em macrófagos murinos, foi realizado ensaios para avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações usando como referência concentrações descritas na literatura para atorvastatina (Pfizer) nas concentrações de 5, 7, 10, 20 e 40 µM (Shrivastava-Ranjan *et al.*, 2018; España *et al.*, 2019), dasatinibe (Sigma) nas concentrações de 13,7 e 137 nM, 1,375, 2,75 e 5,5 µM (Skoko *et al.*, 2018; Hegedüs *et al.*, 2022) e resveratrol (Sigma) nas concentrações de 20, 50, 80, 100 e 200 µM (Coimbra *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017; Mohd *et al.*, 2019). Após 16 horas de tratamento com diferentes concentrações das drogas, foram realizados ensaios de MTT e LDH para avaliar a viabilidade celular. Para investigar os efeitos profiláticos e/ou terapêuticos, os

macrófagos foram submetidos a pré-tratamento ou tratamento pós-infecção, respectivamente.

4.3 Tratamento com Resveratrol *in vivo*

Para os ensaios *in vivo*, utilizamos a concentração de resveratrol de 50 mg/kg/dia administrada por gavagem oral (Fang *et al.*, 2018). Os animais foram tratados 24 horas antes da infecção e, posteriormente, uma hora após a infecção com os vírus MHV-A59 (3×10^5 PFU) em modelo experimental C57BL/6 WT (machos), mantidos em nível NB2, ou SARS-CoV-2 (7×10^4 PFU) em modelo experimental K18-hACE2 (fêmeas), mantidos em nível NB3. O tratamento foi realizado uma vez ao dia até o momento da eutanásia.

4.4 Análise da viabilidade celular

A citotoxicidade de diferentes concentrações de resveratrol em macrófagos murinos foi avaliada por meio dos ensaios de MTT e LDH, os quais analisam a viabilidade celular. Adicionalmente, esses ensaios foram realizados após pré-tratamento e pós-tratamento com resveratrol durante a infecção pelos vírus MHV-3 e MHV-A59, com o objetivo de avaliar a viabilidade celular nas diferentes condições experimentais. Para avaliar a morte celular, foi realizado um teste cinético de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin) para determinação da Desidrogeranase láctica (LDH), uma enzima citosólica, que quando liberada indica que as células tiveram a sua membrana plasmática rompida. A Desidrogenase Láctica (LDH) catalisa a redução do Piruvato com o NADH, obtendo o Lactato e NAD⁺. Foi realizado o cálculo da média das diferenças de absorbância por minuto (**LDH (U/L) = $\Delta A / \text{min.} \times 8016$**) e os resultados foram expressos em U/L. Para analisar a viabilidade dos macrófagos, foi realizado o ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; SIGMA), que avalia a função mitocondrial de células metabolicamente ativas. Esse método se baseia na capacidade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase de reduzir o tetrazólio (MTT) em cristais insolúveis de formazan que se acumulam em células com metabolismo ativo. O formazan apresenta uma coloração azul ou roxa, cuja intensidade é um indicador direto da viabilidade celular. A leitura desse ensaio colorimétrico foi realizada em um leitor de microplacas (Agilent BioTek Epoch), utilizando o comprimento de onda de 570 nm para determinar o valor da absorbância.

4.5 Ensaio de adsorção e internalização viral

O efeito dos tratamentos com os fármacos atorvastatina e dasatinibe sobre a etapa adsorção viral foi avaliado conforme metodologia de Pujol e colaboradores (2012). Este ensaio permite avaliar se o tratamento com os fármacos pode interferir na ligação do vírus à membrana da célula hospedeira (adsorção) ou entrada do vírus na célula (internalização), o que poderia bloquear a infecção viral nessas etapas.

Adsorção: Em uma placa de 48 poços foram adicionados 200 μL contendo 5×10^5 células RAW 264.7 por poço que foram incubadas overnight. Os macrófagos foram tratados previamente por 16 horas com os fármacos atorvastatina (10 e 20 μM) ou dasatinibe (13,7 e 137 nM). Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células foram infectados na MOI de 0.01 do vírus MHV-3 na presença da atorvastatina ou dasatinibe. As placas ficaram incubadas a 4°C para adsorção viral sendo agitadas a cada 15 minutos, nesta temperatura ocorre a inativação das enzimas relacionadas com o processo de internalização do MHV-3, bloqueando a progressão do ciclo de multiplicação para a etapa de internalização. Após 1 hora a 4 °C, tanto os fármacos quanto o vírus não adsorvido foram removidos. As células foram lavadas com PBS 1X frio estéril e posteriormente, adicionado CMC 0,8% a 10% de SFB e as placas incubadas por 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C para formação de placas do vírus. Após esse período, foi adicionado formaldeído a 10% em cada poço por 1 hora a temperatura ambiente. O formaldeído foi descartado e os poços foram corados com cristal violeta 1% (p/v) durante 1 hora. A infectividade viral foi analisada por meio da redução do número de PFU em relação ao controle infectado que não recebeu tratamento.

Internalização: O efeito do tratamento com a atorvastatina ou dasatinibe na etapa de internalização viral também foi avaliado para verificar se os fármacos poderiam estar atuando em etapas após a adsorção viral. Para o ensaio de internalização, os macrófagos foram previamente tratados por 16 horas com os fármacos atorvastatina (10 e 20 μM) ou dasatinibe (13,7 e 137 nM). Após esse período, o sobrenadante foi descartado, as células infectadas na MOI de 0.01 do vírus MHV-3 e as placas incubadas a 4°C por 1 hora, sendo as placas agitadas cuidadosamente a cada 15 minutos. Após esse período, as células foram lavadas e incubadas a 37 °C por 1 hora em meio DMEM contendo as concentrações dos fármacos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS 1X e tratadas com tampão de citrato (40 mM de ácido cítrico, 10 mM de KCl, 135 mM de NaCl, pH 3) por 1 minuto para inativar o vírus não adsorvido. Posteriormente, o tampão citrato foi descartado e foi adicionado aos poços 1 mL de CMC 0,8% e as placas foram

incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 48 horas e o efeito citopático foi observado. Posteriormente, foi adicionado formaldeído a 10% em cada poço por 1 hora a temperatura ambiente. O formaldeído foi descartado e os poços foram corados com cristal violeta durante 1 hora. A diminuição da infectividade viral foi analisada por meio da redução do número PFU em relação ao controle infectado e não tratado.

4.6 Linhagens de camundongos

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e os camundongos K18-hACE2 adquiridos dos Laboratórios Jackson e mantidos no Biotério do departamento de bioquímica e imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG). Os animais foram alojados em microisoladores ventilados individualmente, colocadas em biotério a 24 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, recebendo acesso *ad libitum* a água e comida. Os procedimentos experimentais com animais C57BL/6 foram realizados com grupos de machos com idade entre 7 e 8 semanas nas instalações NB2. Os ensaios com K18-hACE2 foram utilizados machos e fêmeas de 15 a 20 semanas nas instalações NB3. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), submetidos à análise do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFMG e aprovados sob os números de protocolos 32/2021 e 191/2021.

Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos: grupo controle e grupo CAF. O grupo controle recebeu dieta padrão para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo/PR). Já o grupo CAF recebeu dieta hipercalórica do tipo cafeteria contendo pellets salgados (25% batata frita tipo chips industrializada, 25% amendoim, 30% manteiga sem sal e 20% ração padrão para roedores) e pellets doces (25% leite condensado, 25% biscoito wafer de chocolate, 30% amendoim e 20% ração padrão para roedores), com livre acesso à água contendo açúcar refinado (105 mg/mL) (Oliveira *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta a composição nutricional das dietas controle e cafeteria calculada de acordo com os fabricantes dos produtos. As dietas foram fornecidas por 4 semanas, a partir de 8 semanas de idade, de forma que os animais dos grupos dieta controle e CAF tivessem 12 semanas de idade no momento da eutanásia (Figura 10).

Tabela 1 - Composição Nutricional das Dietas Controle e Cafeteria

Composição	Dieta controle kcal%	Dieta de Cafeteria kcal%
Proteínas	31,1	11
Carboidratos	65,8	31
Lipídeos	3,1	58
KCAL/G	4,0	5,8

Elaborada pela autora.

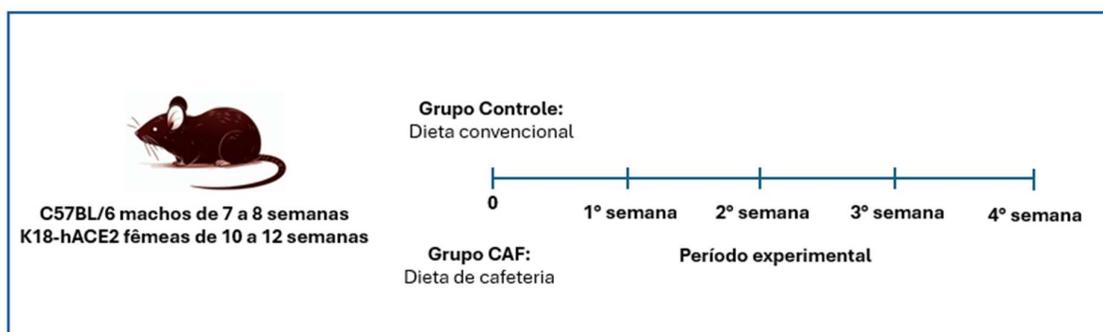


Figura 11. Representação esquemática do delineamento experimental do modelo de obesidade induzido por dieta de cafeteria. Elaborada pela autora.

4.7 Peso Corporal, Consumo de Ração e Índice de Adiposidade

O peso corporal e o consumo de ração dos animais foram avaliados semanalmente durante as 4 semanas de estudo. Amostras dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico dos grupos controle e CAF foram coletadas e pesadas no momento da eutanásia para a avaliação do índice de adiposidade que reflete a proporção de gordura em relação ao peso total do animal, calculado de acordo com a equação abaixo (Oliveira *et al.*, 2017).

$$\text{Índice de Adiposidade (\%)} = \frac{\sum \text{Peso dos Tecidos Adiposos}}{\text{Peso do Animal}} \times 100$$

4.8 Avaliação de parâmetros metabólicos

Para avaliar os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides nos animais submetidos a dieta de cafeteria (CAF) e animais submetidos a dieta convencional (DC) tratados com resveratrol durante a infecção com MHV-A59 ou SARS-CoV-2, foram utilizados os kits de glicose

monoreagente, colesterol monoreagente e triglicérides monoreagente (Bioclin) conforme instruções do fabricante.

4.9 Infecção por MHV-A59 e SARS-CoV-2

Os camundongos C57BL/6 foram anestesiados com isoflurano a 3% para instilação nasal de 30 μL do vírus MHV-A59 no inóculo de 3×10^5 PFU ou solução salina estéril (mocks) em condição NB2. Enquanto os animais K18-hACE2 foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina (Syntec, 50 mg/kg): xilazina (Syntec, 5 mg/kg) e receberam uma inoculação intranasal de 30 μL de solução salina estéril carregada ou descarregada (mocks) com o inóculo de 7×10^4 PFU de SARS-CoV-2 (isolado clínico de um swab nasofaríngeo obtido de um caso confirmado de COVID-19 no Rio de Janeiro, Brasil, número de acesso do GenBank MT710714, variante gama, 2×10^4 PFU) sob condição NB3.

4.10 Titulação viral

Para analisar os títulos virais no sobrenadante de cultura da linhagem celular RAW 264.7 após infecção com os vírus MHV-3 ou MHV-A59, foi utilizado 50 μL do sobrenadante que foi diluído 1:9 por meio de diluição seriada (10^{-1} a 10^{-6}) em 450 μL 1:9 por meio de diluição seriada (10^{-1} a 10^{-6}) em meio DMEM suplementado a 2% com SFB. As diluições do sobrenadante foram plaqueadas em monocamadas da linhagem celular L929 em placas de 24 poços. Após incubação sob agitação a cada 15 minutos por 1 hora para adsorção viral, foi adicionado 1 mL de DMEM contendo 0,8% de carboximetilcelulose (CMC), suplementado com 2% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 48 horas. Após esse período, as células foram fixadas com formol a 10% durante 2 hora e posteriormente, coradas com cristal violeta 0,1% durante 1 hora. O título viral foi determinado pela contagem de Unidade Formadora de Placa (UFP)/mL.

Para avaliar o título viral no tecido, a suspensão viral diluída serialmente das amostras de pulmão (1:9 tecido para DMEM) foram inoculadas em uma monocamada confluyente de células L929 cultivadas em placas de 24 poços. Após agitação suave por 1 hora, as amostras foram removidas e substituídas por DMEM contendo 0,8% de carboximetilcelulose, 2% de FBS e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina, sendo mantidas por 48 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as células foram fixadas com uma

solução de formalina tamponada neutra a 10% por 2 horas e coradas com 0,1% de cristal violeta. Os títulos virais foram determinados como PFU/mL ou PFU/mg de tecido.

4.11 Ensaio de citocinas e quimiocinas

Para análise dos níveis de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos RAW 264.7 durante infecção com MHV-A59 ou MHV-3 e tratamentos com resveratrol, foram utilizados 100µL do sobrenadante para os ensaios. Enquanto nos ensaios com o tecido pulmonar utilizamos os homogenatos pulmonares a partir de 50 mg de tecido congelado em 1000 mL de tampão de extração de citocinas frio (Tris 100 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 mM, desoxicolato de sódio a 1%, 0,5% e coquetel inibidor de protease 1%. Após centrifugação a 14.000× g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e as níveis das citocinas de TNF, IL-10, IL-6, IFN-β, CCL2 e CXCL1 foram avaliadas usando o sistema DuoSet ELISA de camundongo (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

4.12 Ensaio de ROS

Para avaliar o papel antioxidante do resveratrol em neutrófilos derivados da medula óssea (BMDN) durante a infecção *in vitro* por MHV-A59, os neutrófilos foram isolados dos ossos femorais de 5 animais do grupo com dieta controle e 5 animais do grupo CAF, após sobredose de solução anestésica de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), seguida de deslocamento cervical conforme metodologia de Vong *et al.* (2013). As epífises dos fêmures foram cortadas com auxílio de um bisturi e, com uma agulha hipodérmica 20 G acoplada a uma seringa contendo 1 mL de meio de cultura RPMI estéril, os ossos femorais foram lavados duas vezes para a extração da medula óssea que foi armazenada em tubo falcon na temperatura 4°C. Após centrifugação por 5 minutos a 1500 RPM, a medula foi ressuspensa em 3 mL de meio RPMI que foi adicionado cuidadosamente ao gradiente de densidade Histopaque™ 1077 e 1119 (GE Healthcare™). O gradiente com a amostra de medula foi centrifugado a 2.000 rpm por 50 minutos em aceleração 0 e desaceleração 0. A nuvem de granulócitos foi coletada cuidadosamente transferida para outro tubo falcon. Foi adicionado 3 mL de RPMI para lavar os neutrófilos e retirar os histopaques. Os neutrófilos foram contados com auxílio da câmara de Neubauer e após a contagem a pureza dos neutrófilos foi confirmada por contagem do cytospin. A concentração de 5×10^4 de neutrófilos foi plaqueada em placa de 96 poços de acordo grupos experimentais (Tabela 2).

Grupos experimentais	
Dieta controle	Dieta de cafeteria
Neutrófilo (sem sonda H ₂ DCFDA)	Neutrófilo (sem sonda H ₂ DCFDA)
Neutrófilo (com sonda H ₂ DCFDA)	Neutrófilo (com sonda H ₂ DCFDA)
Neutrófilo + Resv + H ₂ DCFDA	Neutrófilo + Resv + H ₂ DCFDA
Neutrófilo + Resv+ MHV-A59 + H ₂ DCFDA	Neutrófilo + Resv+ MHV-A59 + H ₂ DCFDA
Neutrófilo + MHV-A59+ H ₂ DCFDA	Neutrófilo + MHV-A59+ H ₂ DCFDA
Neutrófilo + Menadiona+ H ₂ DCFDA	Neutrófilo + Menadiona+ H ₂ DCFDA
Neutrófilo+ Menadiona+ Resv + H ₂ DCFDA	Neutrófilo+ Menadiona+ Resv + H ₂ DCFDA

Tabela 2. Grupos experimentais para o ensaio de ROS em BMDN. Elaborado pela autora.

Os neutrófilos foram pré-tratados ou não por 1 hora na concentração de 80 μ M do Resveratrol e a placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, os neutrófilos foram infectados com o vírus MHV-A59 a uma MOI de 1 e tratados, ou não, com resveratrol na concentração de 80 μ M. Como controle positivo, os neutrófilos foram tratados com Menadiona na concentração de 20 μ M para a indução da liberação de ROS. Para medir a cinética da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) liberado pelos neutrófilos derivados da medula de animais na dieta controle e animais CAF foi utilizada a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA) da Thermo Fisher Scientific. A sonda H₂DCFDA, uma forma quimicamente reduzida da fluoresceína, é permeável à célula e após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, o H₂DCFDA, que é não fluorescente, é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente. Para o ensaio, 10 μ L da sonda H₂DCFDA foram adicionados aos poços a uma concentração final de 20 μ M, e as placas foram incubadas no leitor de microplacas Synergy (BioTek) a 25°C. O ensaio foi realizado por fluorescência, com excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, utilizando a lâmpada de tungstênio, e as leituras foram feitas a cada 20 minutos, por um período total de 6 horas.

4.13 Letalidade

Para a análise da letalidade durante a infecção com MHV-A59 (3×10^5 PFU-inóculo subletal), os animais foram tratados com resveratrol (50 mg/kg/dia) 24 horas antes da infecção, uma hora após a infecção e, posteriormente, uma vez ao dia durante dez dias. Durante os dez dias foram analisados os parâmetros clínicos como aparência do pelo,

cianose, atividade, coordenação motora, olhos e nariz (presença de secreção), postura e qualidade da respiração. Além disso, os animais foram monitorados quanto a perda de peso durante o período experimental e antes da perda de 20% do peso os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésicos (quetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg intraperitoneal).

4.14 Coleta de tecidos e avaliação hematológica

Após sobredose de anestésico (quetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg intraperitoneal), controle (mock), camundongos infectados com MHV-A59 ou SARS-CoV-2 e o grupo tratado com Resveratrol e infectados com MHV-A59 foram eutanasiados no segundo e quinto dia após infecção (2 e 5 dpi) e os animais K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2 foram eutanasiados no terceiro dia após infecção (3 dpi) para coleta dos tecidos. Amostras de sangue foram coletadas da veia cava abdominal e colocadas em tubos revestidos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; BD, São Paulo, Brasil) para contagem de células totais e diferencial do sangue pelo Hemocitômetro Celltac MEK-6500K (Nihon Kohden, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) para o sangue dos animais C57BL/6 infectados ou não com MHV-A59. A contagem total de sangue dos animais K18-hACE2 foi realizada por lâmina de esfregação em condição NB3. Os tecidos adiposos (Epididimal, Mesentérico e Retroperitoneal), lóbulos direito dos pulmões e o fígado foram colhidos e rapidamente enxaguados com solução salina fria e estéril, e diretamente congelados a -80°C. Outra parte dos tecidos adiposos, lobo esquerdo do pulmão, e fígado foram fixados por imersão em solução de formalina tamponada neutra a 10% (Synth) para a posteriormente serem emblocados em parafina e utilizados na confecção das lâminas de H&E e/ou imunohistoquímica. As amostras de tecidos obtidos em condição NB2 foram destinadas à análise do índice de adiposidade, ensaios bioquímicos, titulação viral por contagem de UFP ou quantificação da carga viral por qPCR, e dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA.

4.15 Avaliação histopatológica

Os tecidos foram fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) foram seccionados em fatias de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e examinados sob microscopia óptica. A lesão mediada por inflamação nos pulmões de

camundongos foi determinada por um patologista (CMQJ) que estava cego em relação ao experimento, empregando um sistema de pontuação abrangendo (i) inflamação das vias aéreas (até 4 pontos); (ii) inflamação vascular (até 4 pontos); (iii) inflamação do parênquima (até 5 pontos); e (iv) infiltração geral de neutrófilos (até 5 pontos) adaptado de Horvat *et al.*, 2007. As lesões patológicas fundamentais, incluindo sinais de inflamação (ou seja, infiltração de células inflamatórias e edema), morte celular (ou seja, necrose), hiperplasia tecidual e hemorragia, foram avaliadas quanto à intensidade e extensão e graduadas de acordo com o escore adaptado.

4.16 Parâmetros de dano pulmonar

Para avaliar se o tratamento com resveratrol poderia auxiliar na redução do dano pulmonar ocasionado pela infecção pelo vírus MHV-A59, analisamos os níveis de proteínas totais, a liberação de LDH no lavado broncoalveolar (BAL) e a concentração de nitrito no sobrenadante do homogeneizado pulmonar dos animais. A quantificação de proteínas totais foi realizada utilizando o ensaio de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay - Bio-Rad) e os níveis de LDH foram avaliados por meio do kit Bioclin, seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de nitrito no sobrenadante do homogeneizado pulmonar foram determinados pelo ensaio de reação de Griess adaptado para microplacas. Para isso, o pulmão dos animais de cada grupo (50 mg de tecido em 500 μ L de PBS 1X estéril) foi homogeneizado no equipamento TissueLyser (Qiagen) e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, 100 μ L do sobrenadante foi coletado para a realização do ensaio. As soluções reagentes para o ensaio de Griess foram preparadas da seguinte maneira: solução A (1 g de sulfanilamida dissolvida em 100 mL de ácido fosfórico a 2,5%) e solução B (0,1 g de N-(1-naftil)etilenodiamina diidroclorido dissolvida em 100 mL de ácido fosfórico a 2,5%). Ambas as soluções foram misturadas em volumes iguais para obter a solução C. A curva padrão de nitrito foi confeccionada a partir de uma solução estoque de 10 mM de nitrito (6,9 mg de NaNO_2 diluído em 10 mL de água destilada). Essa solução foi diluída em série (1:100), sendo o primeiro ponto equivalente a 100 μ M. Nos poços da placa, foram adicionados 100 μ L da amostra ou padrão e, em seguida, 50 μ L da solução C. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas (Biotek). Os resultados foram expressos em μ g/mL.

4.17 Imunohistoquímica do pulmão

O tecido pulmonar de camundongo em lâmina foi fixado em paraformaldeído a 4% em PBS por 24 horas. O paraformaldeído foi descartado e os tecidos foram lavados em água corrente. Em seguida, as amostras foram processadas em álcool 70% e xilol e embebidas em parafina. Os blocos de parafina de cada grupo experimental foram seccionados em micrótomo a uma espessura de 4 μ m e as secções foram montadas em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost) para a imuno-histoquímica. As lâminas foram aquecidas a 60°C por 1 hora, seguidas por desparafinização na bateria de xilol (xilol I- 30 minutos; xilol II – 10 minutos; xilol III- 5 minutos) e hidratação em séries decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) até água destilada (5 minutos). Para exposição dos epítomos de Ly6G, uma proteína de superfície celular presente em neutrófilos maduros e comumente utilizada como marcador específico de neutrófilos, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica em EDTA ph 9 em banho maria a 96°C por 20 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio (2 banhos de 15 minutos cada) para inativar a atividade da peroxidase endógena. Em seguida, as lâminas foram lavadas em TBS 1X, as bordas foram secas com papel sem deixar os cortes ressecarem e com auxílio de uma caneta hidrofóbica foram feitos círculos ao redor dos cortes as lâminas foram incubadas com Protein Block (Abcam) por 5 minutos em câmara úmida. O bloqueio foi descartado e 30 μ L do anticorpo primário de Ly6G (rabbit - diluição 1:2000) foi adicionado e as lâminas foram incubadas *overnight* (em torno de 18 horas) em câmara úmida a 4°C. Após a lavagem das lâminas em TBS 1X, foi adicionado o anticorpo secundário biotinalado kit ABC (Proporção: 15 microlitros soro + 1 mL PBS + 5 microlitros anticorpo) em câmara úmida por 30 min a temperatura ambiente. Após lavagens com TBS 1X, as lâminas foram incubadas com o kit streptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Foi feita a lavagem das lâminas em TBS 1X e adicionado o DAB (3,3'-diaminobenzidina) sobre os cortes e a reação foi observada. Para parar a reação as lâminas foram lavadas em água destilada e foi realizada a hidratação dos cortes de pulmão contidos nas lâminas na bateria de etanol (70%, 90%, 100%) e posteriormente em xilol (xilol I, II, III) e montagem das lâminas através da colagem de lamínulas sobre as lâminas com entellan. Como controle negativo, uma das lâminas foi incubada com o anticorpo primário, e os demais passos do protocolo foram realizados,

exceto a adição do anticorpo secundário. A aquisição das imagens de 40 campos por pulmão foi feita através do microscópio Leica Microsystems no aumento de 40x e as imagens de neutrófilos Ly6G+ por mm² foram analisadas no software Imagej 1.54d. A porcentagem de células Ly6G+ por mm² foi obtida pela soma do total de células (40 campos) dividida pela soma da área de todos os campos.

4.18 Expressão de genes por PCR em tempo real

O RNA total do estoque viral e das amostras de pulmão foram extraídas com o kit BioGene de extração de DNA/RNA viral, e as amostras de tecido adiposo epididimal e gonadal de camundongos foram extraídas com TRizol (Invitrogen). Esse RNA foi utilizado para confecção da fita de DNA complementar (cDNA) com o auxílio do kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A medida do PCR em tempo real foi realizada por meio de um sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Warrington, UK) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados pelo método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Para as amostras de camundongos, o valor de Ct (Threshold Cycle) de cada amostra foi subtraído do valor de Ct do gene de referência 18S para calcular o Δ Ct. Em seguida, o Δ Ct de cada grupo experimental foi comparado ao Δ Ct dos respectivos grupos controle para determinar o $\Delta\Delta$ Ct. Para determinar a carga viral no tecido adiposo epididimal dos animais C57BL/6 CAF e dieta controle, a normalização foi realizada utilizando os valores de Ct da curva de diluição do estoque viral (diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁷) para os vírus MHV-3 e MHV-A59, e os resultados foram representados em log₁₀. Para determinar a carga viral no tecido pulmonar e tecido adiposo gonadal dos animais K18-hACE2 CAF e K18-hACE2 dieta controle foi utilizado o Kit SARS-CoV-2 Research Use Only qPCR Primer & Probe Kit: N1, N2 & RP (IDT) e o iTaq Universal Probes One-Step (Biorad) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Os primers utilizados assim como suas sequências são apresentados na tabela:

Gene	Forward	Reverse
Proteína N – MHV	5'-CAGATCCTTGATGATGGCGTAGT-3'	5'-AGAGTGTCCATCCCGACTTTCTC-3'
TNF <i>Mus musculus</i>	5' - CCCTCACACTCAGATCATCTTCT - 3'	5' - GCTACGACGTGGGCTACA - 3'
18S <i>Mus musculus</i>	5' - CGTTCCACCAACTAAGAACG - 3'	5' - CTCAACACGGGAAACCTCAC - 3'

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados na qPCR do pulmão e tecido adiposo visceral epididimal ou gonadal). Elaborado pela autora.

4.19 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. Os resultados foram analisados quanto a sua distribuição em paramétrico ou não paramétricos pelos testes Anderson-Darling, teste de normalidade onisciente de D'Agostino-Pearson, teste de normalidade de Shapiro-Wilk, teste de Kolmogorov-Smirnov com valor-p de Dallal-Wilkinson-Lilliefors. O teste de One-way ANOVA que verifica se as médias de "k" amostras independentes (tratamentos) diferem entre si, e foi utilizado para análise das diferenças entre pelo menos três grupos, e a comparação entre dois grupos pode ser obtida através do teste t. Quando necessário foi usado o teste Two-way ANOVA que avalia se existe diferença entre duas variáveis categóricas, e foi utilizado para análise em um mesmo grupo. O pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre todas as médias após a análise de variância, enquanto o pós-teste de Sidak foi aplicado para comparações específicas entre médias pré-definidas. Para avaliar a relação de um valor com a média de um conjunto de dados, foi utilizada a medida estatística Z-escore. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Capítulo 1 –Efeitos do tratamento com Dasatinibe em linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectadas com MHV-3

Esse capítulo compõe o artigo científico intitulado "**Dasatinib Inhibits Betacoronavirus Replication in Macrophages and Attenuates Pro-Inflammatory Mediators via SRC-MAPK Pathway Modulation**" que está em fase de revisão no periódico *Medical Microbiology and Immunology*. Esta etapa do trabalho está inserida na chamada Capes 38/2022 e foi realizada em colaboração com a Prof. Dra. Diana Bahia.

Ana Carolina Santos Ricoy¹, Marina Pimenta Braga¹, Thaís Targino Ferreira Lacerda¹, Flávia Rayssa Braga Martins¹, Ana Clara Mendes¹, Mauro Martins Teixeira², Vivian Vasconcelos Costa³, Diana Bahia^{1†} and Frederico Marianetti Soriani^{1†*}

¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

† These authors contributed equally to this work and share the last authorship.

* Correspondence: fredsori@gmail.com; dianabahia@gmail.com

Acknowledgments: We are thankful to Ilma Marçal S., Rosemeire A. Oliveira and Leticia Soldati.

Keywords: Dasatinib (DASA), MHV-3 betacoronavirus, macrophages, Src-family kinases, MAPK signaling pathway.

Abstract

Betacoronaviruses are emerging pathogens with pandemic potential, as shown by the recent COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2. The replication of SARS-CoV-2 in monocytes and macrophages triggers the production of cytokines and chemokines, leading to a persistent inflammatory environment associated with increased disease severity. Dasatinib (DASA) is a broad-spectrum tyrosine kinase inhibitor that targets a wide range of tyrosine kinases, including ABL, SRC, c-KIT, PDGFR- α and β , involved in the pathophysiology of various malignancies. Studies have reported additional mechanisms of action for DASA beyond the oncological context, including anti-inflammatory and antiviral effects. We investigated the potential of DASA as a promising therapeutic approach against betacoronavirus infections. Using an *in vitro* model of infection of RAW 264.7 cells with MHV-3, a betacoronavirus that mimics severe COVID-19 in murine models, we observed that both pre and post-infection treatment with DASA significantly reduced viral titers and pro-inflammatory mediators, such as IL-6, TNF, and CXCL2. Pre-treatment with DASA interfered with the early stages of the viral cycle in macrophages, such as viral adsorption and internalization, reducing viral titers. We demonstrated that SRC tyrosine kinase

signaling is essential during MHV-3 infection. Post-infection treatment with DASA negatively modulated the SRC-MAPK-NF- κ B signaling pathway, reducing the release of pro-inflammatory mediators by macrophages. Our data suggest the potential use of DASA as a promising adjuvant therapeutic strategy for treating coronavirus infections by negatively modulating SRC-mediated signaling pathways involved in inflammation and reducing MHV-3 replication. The results demonstrated that SRC signaling could be a target for interventions in controlling coronavirus infections.

Introduction

The *Betacoronavirus* genus is a member of the *Coronaviridae* family, which includes a variety of positive-sense single-stranded RNA enveloped viruses [1]. These viruses are known to infect humans and have caused zoonotic outbreaks in recent years, including MERS-CoV, SARS-CoV, and the causative agent of the COVID-19 pandemic [1-4]. The Betacoronavirus genus also includes viruses that infect mice, such as the mouse hepatitis virus (MHV), an experimental model for studying coronavirus infections [5].

COVID-19 is a highly transmissible infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus [6]. Pulmonary infection with SARS-CoV-2 can present with mild symptoms such as cough, fever, nasal congestion, and fatigue [7], or more severe symptoms including respiratory failure, severe acute respiratory syndrome (SARS), septic shock, multiple organ failure, and potentially death [6]. The severity of COVID-19 is associated with high levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators such as IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 β , TNF, and chemokines CXCL2, CCL2, and CCL5 resulting from a dysfunctional immune response [8]. The dysfunctional response of pro-inflammatory macrophages plays a key role in the pathological consequences of COVID-19 [9]. In the MHV experimental model, a pneumonia-like condition is also observed along with an increase in the same pro-inflammatory mediators [5]. Despite the successful development of vaccines during the COVID-19 pandemic, there remains a constant concern about the potential emergence of new SARS-CoV-2 variants [10] or even other respiratory viruses such as the Influenza virus [11]. In this context, FDA-approved and competent authority-approved drugs, including immunomodulators, represent a viable therapeutic strategy for dealing with outbreaks caused by emerging viruses [12].

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are one class of promising drugs for emergency repurposing [12-14]. Although originally developed for the treatment of various types of cancer, TKIs may represent a potential solution for treating diseases caused by different viral species, including respiratory viruses [15-21]. A notable example of a TKI is Dasatinib (DASA), a multi-target tyrosine kinase inhibitor directed against BCR-ABL, c-KIT, EPHA2, and SRC family kinases, widely used in clinical settings for treating acute lymphoblastic leukemia, lung cancer, breast cancer, and some solid tumors [22-25]. The SRC family kinases are involved in various cellular processes such as extracellular signal transduction and endosomal signaling [26], cytoskeleton rearrangement [27], and regulation of nuclear proteins [28]. Additionally, studies have demonstrated the role of SRC family kinases in the replication of different viruses [29-34]. However, the mechanism by which DASA affects viral replication remains unknown.

In the context of coronavirus infections, these drugs may act on specific host targets with the dual aim of inhibiting intracellular signaling pathways related to immune response and involved in disease immunopathogenesis, as well as interrupting signaling pathways crucial for the viral cycle [22]. Treatment with DASA has been shown to reduce inflammation in multiple diseases, including lung diseases [35-40]. Studies have shown that the expression of intracellular signaling molecules, such as the SRC family of tyrosine kinases, can activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [41]. MAPK pathway is essential for activating the pro-inflammatory response mediated by the transcription factor NF- κ B [42-43]. Inhibiting the signaling of these pathways can hinder the nuclear translocation of NF- κ B and decrease the expression of genes involved in the inflammatory response [44-45].

We hypothesized that treatment with DASA could have a protective effect against betacoronavirus infection. In this study, we investigated the role of SRC tyrosine kinase activation during MHV-3 infection in murine macrophages, in addition to exploring the possible mechanisms by which DASA may act as an adjuvant treatment in betacoronavirus infections.

Material and Methods

Culture of cell lines and MHV-3 virus

As cell lines RAW 264.7 (ATCC® TIB-71) and L929 (ATCC® CCL-1) were cultured in a controlled atmosphere (37°C, 5% CO₂) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The MHV-3 strain was provided and sequenced (GenBank accession no. MW620427.1; see reference 43) by Clarice Weis Arns and Ricardo Durães-Carvalho from the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brazil), and propagated in L929 cells.

MHV-3 infection of Raw 264.7 cells

Macrophages were infected with different MOIs of the MHV-3 virus (1; 0.1; 0.01 and 0.001) at 4, 8, 16, and 24 hours to evaluate the permissibility of the murine macrophage cell line and the peak of viral infection.

Cytotoxicity assay

RAW 264.7 cell line was plated at a concentration of 5×10^4 in 48-well plates containing 300 µL of DMEM medium with 10% FBS and maintained at 37°C and 5% CO₂ for 16 hours. Cell supernatant was discarded, and the wells were washed with sterile 1X PBS. Then, 300 µL of DMEM medium without FBS, containing DASA (Sigma) at concentrations of 5.5 µM, 2.75 µM, 1.375 µM, 137 nM, and 13.7 nM, were added and incubated for 16 hours at 37°C with 5% CO₂. Cell viability of RAW 264.7 macrophages after treatment with DASA concentrations was assessed using the MTT assay (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) according to the manufacturer Sigma-Aldrich's specifications to determine the drug's cytotoxicity. For cell viability analysis, LDH (Lactate Dehydrogenase – BIOCLIN) test was used, following the manufacturer's instructions. The average absorbance differences per minute were calculated ($\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min.} \times 8016$), and the results were expressed in U/L.

Infection, treatment with DASA and plaque assay

Macrophages were pre-treated or treated post-infection with DASA at concentrations of 13.7nM and 137nM for 16 hours. Supernatant was discarded, and the macrophages were infected with murine betacoronavirus MHV-3 at an MOI of 0.01 for one hour, with gentle agitation (4×15 minutes) at 37°C and 5% CO₂. After one hour of adsorption, the supernatant

was discarded, the wells were washed with sterile 1X PBS, and 300 μ L of DMEM medium with 0% FBS were added. After infection, the macrophages were incubated in the presence or absence of the vehicle (0.02% DMSO) to demonstrate that the concentration of the vehicle used for drug dilution did not affect cell viability. The plates were then incubated for 16 hours at 37°C and 5% CO₂. For viral titration, 100 μ L of the supernatant was serially diluted (10^{-1} to 10^{-6}) and inoculated onto a confluent monolayer of L929 cells cultured in 24-well plates. After gentle agitation for 1 hour (4 \times 15 minutes), the samples were removed and replaced with overlay medium (DMEM containing 0.8% carboxymethylcellulose, 2% FBS, and 1% penicillin-streptomycin-glutamine) and maintained for 48 hours at 37°C and 5% CO₂. Subsequently, the cells were fixed with 10% neutral buffered formalin (NBF) for 1 hour and stained with 0.1% crystal violet. Viral titers were determined as Plaque-Forming Units (PFU) per mL of supernatant.

Analysis of inflammatory mediators

The levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF, as well as chemokine CXCL2 in the supernatant, were obtained using DuoSet enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems 348). The assays followed the manufacturer's instructions. The absorbance found in the samples was compared with the specific standard curve of known values for each assessed cytokine/chemokine.

Western Blot

RAW 264.7 cells at a concentration of 2×10^7 in 12-well plates were washed with cold PBS and total cellular protein was extracted in lysis buffer [1% Triton X-100 (Merck), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM Sodium Orthovanadate (Na_3VO_4)] with the addition of a protease and phosphatase inhibitor cocktail [20 μ L of Aprotinin, 20 μ L of Leupeptin, 100 μ L of PMSF 100 mM, 10 μ L of DTT 1M, 250 μ L of NaF 1M]. The cell lysates were collected and centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The resulting cell-free supernatant was collected and stored at -80°C until further use. An aliquot was retained for protein concentration determination using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Australia) according to the manufacturer's instructions, for the use of 40 μ g of protein from experimental groups. Western blot assays were performed according to the methodology adapted from Maza *et al.* (2017) [46]. The membranes were incubated with primary antibodies (Phospho-NF- κ B p65 (Ser536), Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182),

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), and Phospho-Src (Tyr416)) at 1:1000 dilutions (5% BSA, 1X TBS, 0.1% Tween 20) overnight at 4°C. The membranes were incubated with a secondary antibody at a 1:2000 dilution for 1 hour at room temperature. The blots were incubated with Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) and the detection of proteins was visualized in ImageQuant LAS 4000. The quantification of densitometry using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) with β -actin as a loading control. The experiment was performed in biological triplicates.

Viral adsorption and internalization assay

Monolayers of RAW 264.7 cells (5×10^5 per well in 24-well plates) were pretreated with DASA at concentrations of 13.7 and 137 nM for 16 hours. After treatment, macrophages were infected with MHV-3 virus at an MOI of 0.01, and the effects of DASA treatment on the adsorption and internalization stages of the MHV-3 betacoronavirus were evaluated following a methodology adapted from Pujol *et al.* (2012) [47]. The concentrations of DASA were present during adsorption at 4 °C and in the medium added after viral adsorption and internalization. The cells were fixed and stained as previously described for subsequent PFU analysis.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 software. Initially, a normality test was performed to verify the data distribution. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test were used to analyze variance and compare means between experiments. When necessary, differences between different groups were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

MHV-3 virus infection in murine macrophages

Initially, the standardization of MHV-3 murine betacoronavirus infection was performed in the RAW 264.7 cell line. Accordingly, the macrophages were infected with different viral MOIs (1, 0.1, 0.01, and 0.001) at different time points (4, 8, 16, and 24 hours post-infection), and cell viability was assessed using MTT and LDH assays. Additionally, the culture supernatant was collected for viral titer evaluation through PFU counting. In the MTT assays, a reduction in cell viability was observed at the 4-hours time point during infection with MOIs of 1 and 0.1, while at 8 hours, a decrease in viability was noted for viral MOIs of 1, 0.1, 0.01, and 0.001 compared to the negative control, by 32%, 30%, 26%, and 18%, respectively. However, after 16 hours of infection, a greater reduction in cell viability was seen, particularly with the higher MOIs of 1 (76%) and 0.1 (66%), while lower MOIs maintained cell viability above 50%, relative to the negative control. After 24 hours of infection, nearly complete loss of cell viability was observed across all viral MOIs analyzed (Fig. 12A). The LDH release assay results indicated a similar pattern of decreasing cell viability over time. At 4 hours of infection, cell viability decreased with an MOI of 1 for MHV-3. At 8 hours, this reduction was evident for both MOIs of 1 and 0.1 compared to the negative control. A marked drop in cell viability was recorded at 16 hours after infections with MOIs of 1 and 0.1, compared to the control. After 24 hours of infection, all MOIs analyzed showed similar reductions in cell viability (Fig. 12B). The viral titration assays revealed that the peak of MHV-3 infection occurred at 16 hours, evidenced by a higher viral load. After 24 hours, a sharp reduction in viral titer was observed, supporting the results of the MTT and LDH assays, which showed a substantial decline in cell viability. This reduction in cell viability prevented the continuation of the replication cycle for the newly released viral particles (Fig. 12C). Based on the results of the MTT, LDH, and viral titration assays, subsequent experiments were conducted at the 16-hour time point to evaluate the effects of DASA treatments during MHV-3 infection in RAW 264.7 macrophages.

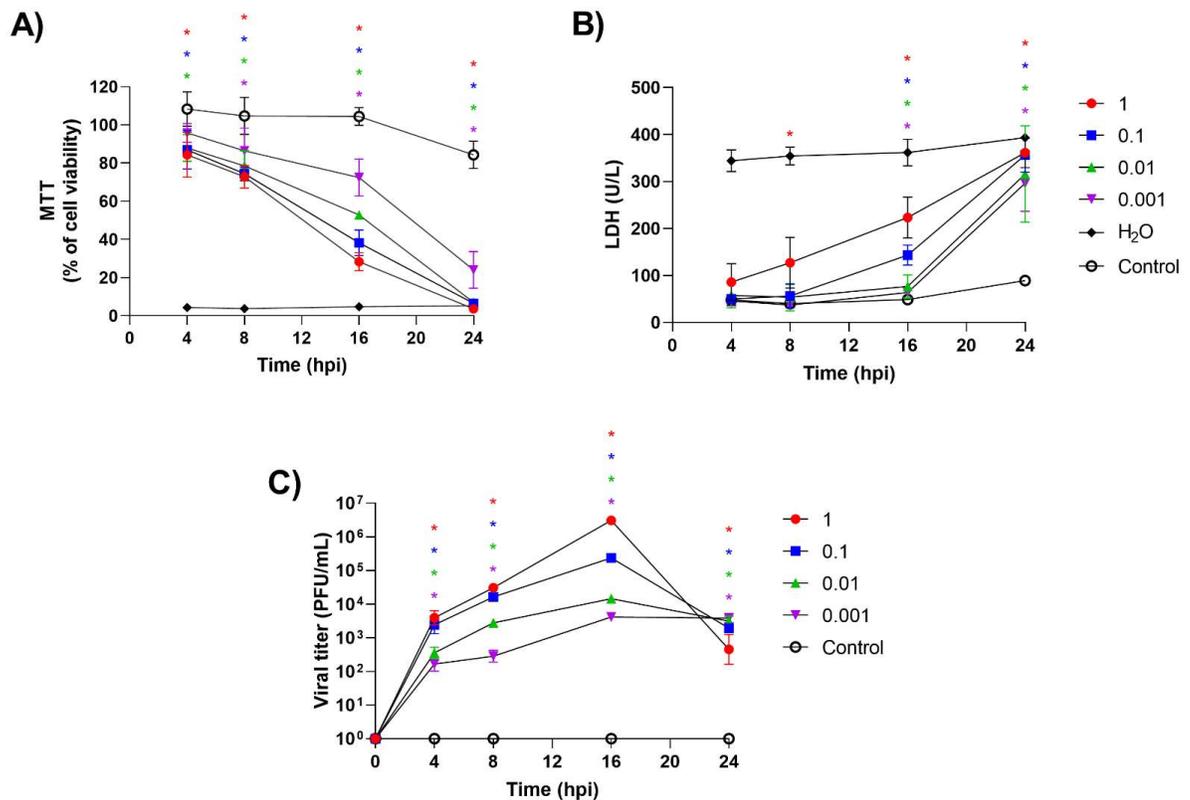


Fig. 12 Standardization of MHV-3 infection in RAW 264.7 cell line. (A) Analysis of cell viability by MTT assay at 4, 8, 16, and 24 hours post-infection with MOIs of 1, 0.1, 0.01, and 0.001 of MHV-3 virus. Decreased cell viability due to virus infection at the respective MOIs was compared to the control. The colors of the asterisks and the hash symbol represent MOIs of the virus at 1, 0.1, 0.01, and 0.001, respectively. (B) Analysis of cell viability by LDH assay at 4, 8, 16, and 24 hours post-infection with MOIs of 1, 0.1, 0.01, and 0.001 of MHV-3 virus. Decreased cell viability due to virus infection at the respective MOIs was compared to the control. The colors of the asterisks and the hash symbol represent MOIs of the virus at 1, 0.1, 0.01, and 0.001, respectively. (C) Evaluation of viral titer in the supernatant collected at 4, 8, 16, and 24 hours post-infection with MOIs of 1, 0.1, 0.01, and 0.001 of MHV-3 virus, compared to the control. The colors of the asterisks symbol represent MOIs of the virus at 1, 0.1, 0.01, and 0.001, respectively. Differences between the infected and control groups were assessed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data is presented as the mean \pm SD (5 to 6 samples per group) from independent experiments performed in duplicate. * Significantly different ($p < 0.05$)

Pre-treatment of macrophages with DASA during MHV-3 infection reduces viable viral titer and pro-inflammatory mediators release

Macrophages play crucial roles as phagocytic cells, participating in both innate and adaptive immune responses, and contributing to various physiological and pathological processes [48]. As central components of the innate immune response, they play a key role in regulating inflammation [49]. To evaluate the *in vitro* effects of DASA, our first step was to investigate the cytotoxicity of different drug concentrations and determine the optimal concentrations for subsequent treatments using RAW 264.7 macrophage cell lineage. Results of MTT and LDH assays for cell viability analysis revealed that treatments of 13.7 nM and 137 nM of DASA were non-cytotoxic to macrophages. While, at concentrations of 1.375 μ M, 2.75 μ M, and 5.5 μ M a significant reduction in cell viability was observed in a concentration dependent manner (Fig. 13A, 13B). Therefore, we evaluated whether treatments with non-cytotoxic concentrations of DASA (13.7 and 137 nM) could demonstrate antiviral and anti-inflammatory effects on macrophages during infection with the MHV-3. To assess the prophylactic potential effects of the non-cytotoxic concentrations of DASA, macrophages were subjected to pre-treatment in the presence of the MHV-3. We observed that pre-treatment with DASA promoted the preservation of macrophages viability during infection with MHV-3 (Fig. 13C, 13D). Pre-treatment with DASA resulted in a significant reduction in viral titers during treatment with concentrations of 13.7 and 137 nM, with diminishments of 0.6 and 1 log scale, respectively (Fig. 13E). Furthermore, we analyzed the levels of pro-inflammatory mediators during pre-treatment with DASA, after 16 hours of infection. Pre-treatment with DASA promoted a significant reduce of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF levels, except for the chemokine CXCL2 (Fig. 13F, 13G, 13H).

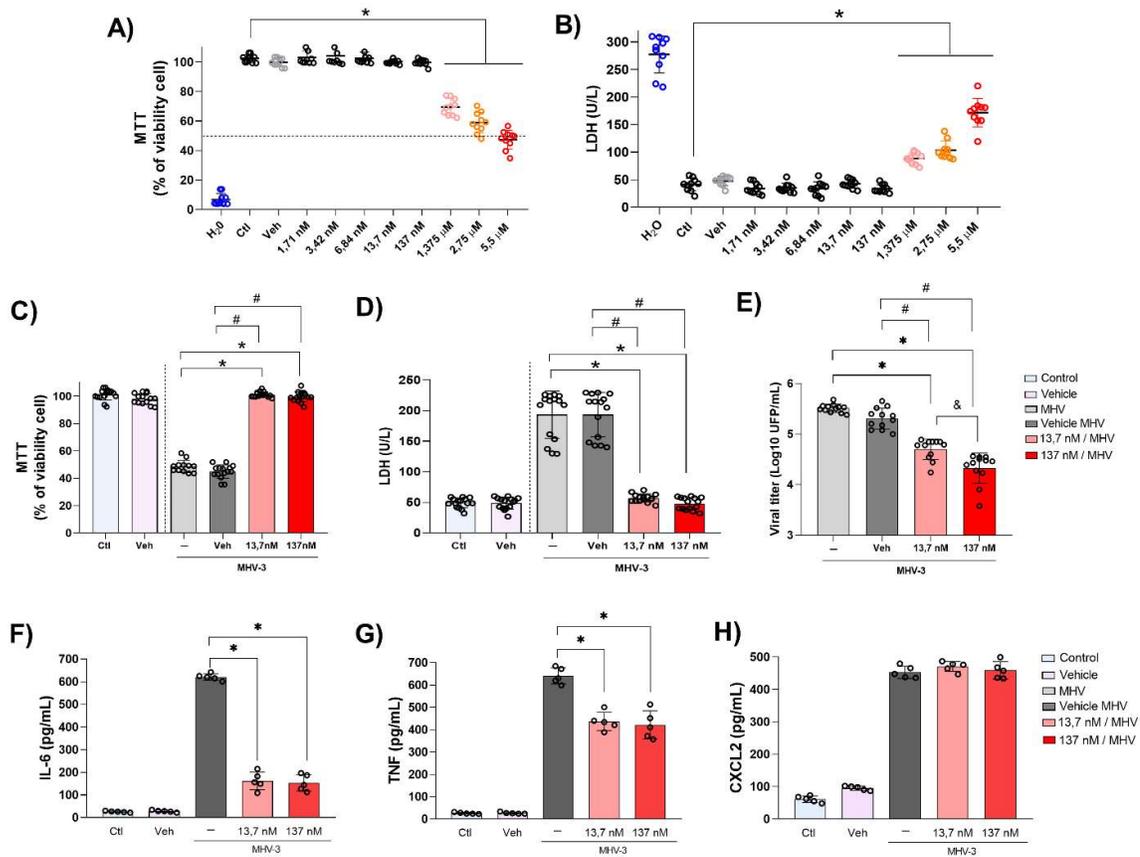


Fig. 13 Effects of DASA pre-treatment in macrophages during MHV-3 infection. Cytotoxicity analysis using MTT (A) and LDH (B) assays following treatment with DASA concentrations of 13.7 nM and 137 nM in macrophages. Sixteen-hour pre-treatment with DASA at 13.7 nM (C) and 137 nM (D) preserves macrophage viability in the presence of MHV-3. (E) Pre-treatment with DASA at 13.7 nM and 137 nM reduces viral titers in the supernatant. DASA pre-treatment reduces IL-6 (F) and TNF (G) cytokine levels, except for the CXCL2 (H) chemokine in supernatant. Differences between the control, infected in the presence or absence of vehicle (Veh – DMSO 0,02%), and/or infected-treated groups were assessed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data is presented as the mean \pm SD (5 to 6 samples per group) from independent experiments performed in duplicate. *, #, & Significantly different ($p < 0.05$)

DASA interferes with the initial stages of the viral cycle, reducing MHV-3 replication in macrophages

To investigate the possible effects of DASA on the viral cycle, we analyzed the early stages of viral infection. The impact on the adsorption and internalization steps was assessed by direct titration of MHV under different treatment conditions. During the viral adsorption

stage, treatment with DASA at concentrations of 13.7 and 137 nM in the presence of the virus resulted in a logarithmic reduction of 0.2 and 0.3 log in viral titers. Interestingly, during the internalization stage, treatment with DASA at concentrations of 13.7 and 137 nM caused a more pronounced decrease in viral entry, resulting in reductions of 1.1 log and 1.5 log in viral titers, respectively (Fig. 14A, 14B).

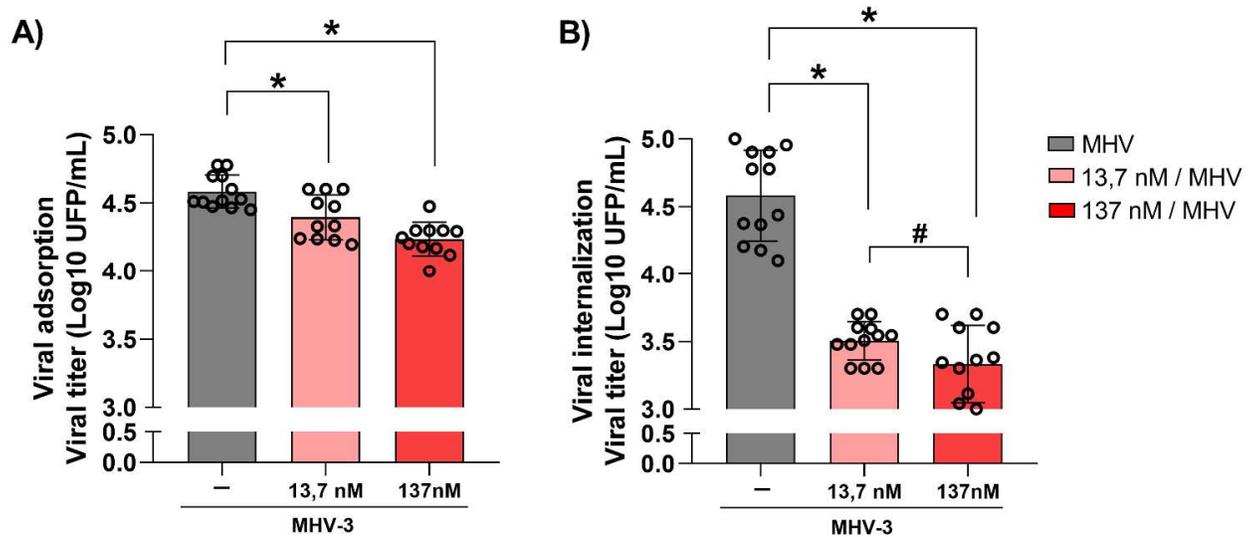


Fig. 14 Treatment with DASA leads to decreased viral titers of MHV-3 during the initial stages of the viral cycle. RAW 264.7 macrophages were pre-treated for 16 hours with concentrations of 13.7 and 137 nM of DASA, then infected with MHV-3 at an MOI of 0.01 at 4°C for 1 hour for the viral adsorption assay (A) and at 4°C for 1 hour followed by 1 hour at 37°C for the viral internalization assay (B). Differences between infected and infected-treated groups were assessed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data is presented as the mean \pm SD (6 samples per group) from independent experiments performed in duplicate. *, # Significantly different ($p < 0.05$)

Therapeutic effect of post-infection DASA treatment on reducing viral titer and inflammatory response in macrophages

To evaluate the therapeutic potential of non-cytotoxic concentrations of DASA, macrophages were treated post-infection with the MHV-3 virus. We observed that post-infection treatment with DASA at concentrations of 13.7 nM and 137 nM preserved macrophage viability during viral infection (Fig. 15A, 15B). Furthermore, post-infection

treatment with DASA at concentrations of 13.7 nM and 137 nM led to a similar reduction of 1.2 and 1.3 log scales, respectively, in viral titers (Fig. 15C). Notably, treatment with DASA at 137 nM promoted a more pronounced reduction in CXCL2 levels and returned IL-6 and TNF to baseline levels (Fig. 15D, 15E, 15F).

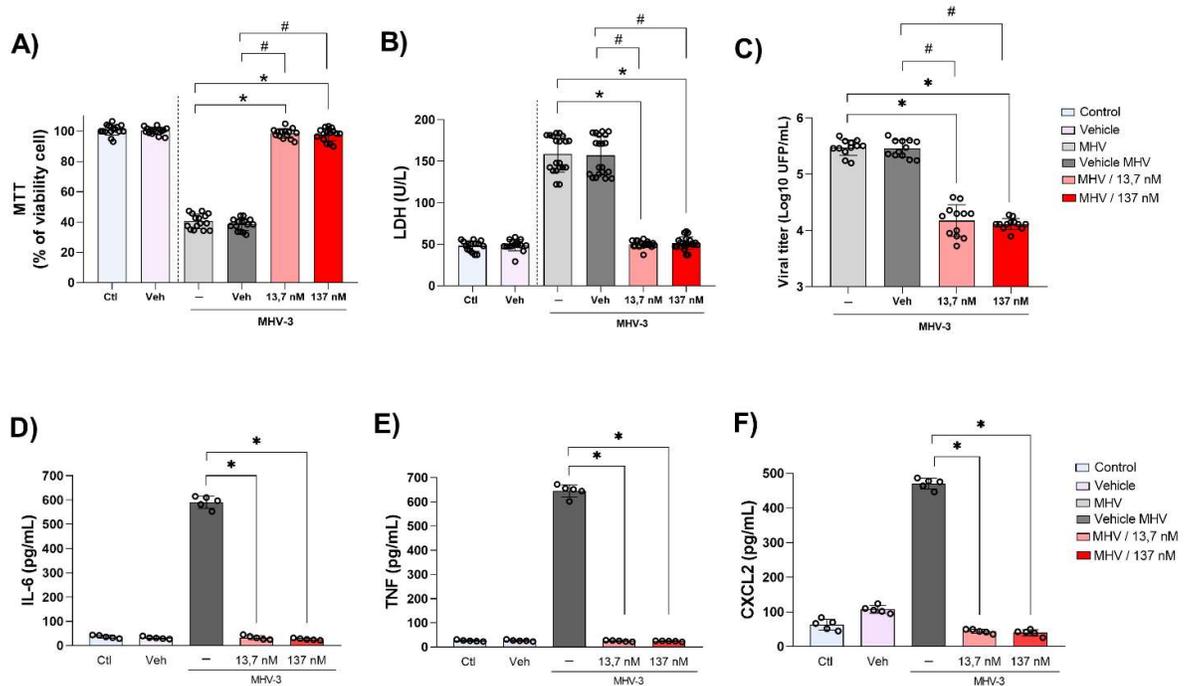


Fig 15 Treatment with DASA post-infection decreases viral titer and pro-inflammatory mediators in macrophages. Post-infection treatment with DASA after MHV-3 infection demonstrated therapeutic effects by preserving macrophage viability, MTT (A) and LDH (B). Reduction in viral titers following treatment with DASA at concentrations of 13.7 nM and 137 nM post MHV-3 infection (C). DASA treatment reduced the production of inflammatory mediators: IL-6 (D), TNF (E), and CXCL2 (F). Differences between the control, infected in the presence or absence of vehicle (Veh – DMSO 0,02%), and/or infected-treated groups were assessed by one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparisons test. Data are presented as the mean \pm SD (5 to 6 samples per group) from independent experiments performed in duplicate. *, # Significantly different ($p < 0.05$)

Therapeutical treatment with DASA negatively modulates the activation of SRC and downstream proteins such as MAPK and NF- κ B

To investigate whether MHV-3 infection in murine macrophages induces the activation of the SRC-mediated signaling pathway and, consequently, downstream proteins such as those of the MAPK family and the transcription factor NF- κ B, and whether treatment with DASA, an inhibitor of SRC family kinases, could modulate this signaling pathway, we analyzed the phosphorylation status of these signaling components using Western blot. The expression of phosphorylated SRC protein (p-SRC) and downstream proteins such as p38 (p-p38), JNK (p-JNK), and ERK1/2 (p-ERK1/2), which are part of the MAPK family, as well as the p65 subunit of NF- κ B during infection with MHV-3 virus at 1, 4, 8, and 16 hours and post-infection treatment with a concentration of 137 nM of DASA was investigated. Results showed that during the infection of macrophages with MHV-3 virus, there was an increase in p-SRC activation at 1, 4, 8, and activation at the 16-hour time point, corresponding to the peak of viral infection (Fig. 16A, 16B). Additionally, infection with MHV-3 virus led to activation of downstream MAPK family proteins, with p-ERK1/2 activation occurring at 4, 8, and 16 hours (Fig. 16A, 16C), p-JNK activation observed at 8 hours and more markedly at 16 hours (Fig. 16A, 16D), while p-p38 activation occurred only at 16 hours (Fig. 16A, 16E). However, the activation of the NF- κ B transcription factor in macrophages after infection with MHV-3 was observed only at 1 hour (Fig. 16A, 16F). Interestingly, we found that post-infection treatment with DASA not only reduced p-SRC expression at the evaluated times but also led to a significant reduction in the activation of downstream proteins such as p-ERK1/2 (4, 8, and 16 h), p-p38 (16 h), p-JNK (16 h), and p-p65 of NF- κ B (1 h), which may have led to a reduction in the release of pro-inflammatory mediators by macrophages (Fig. 16A, 16B, 16C, 16D, 16E, 16F).

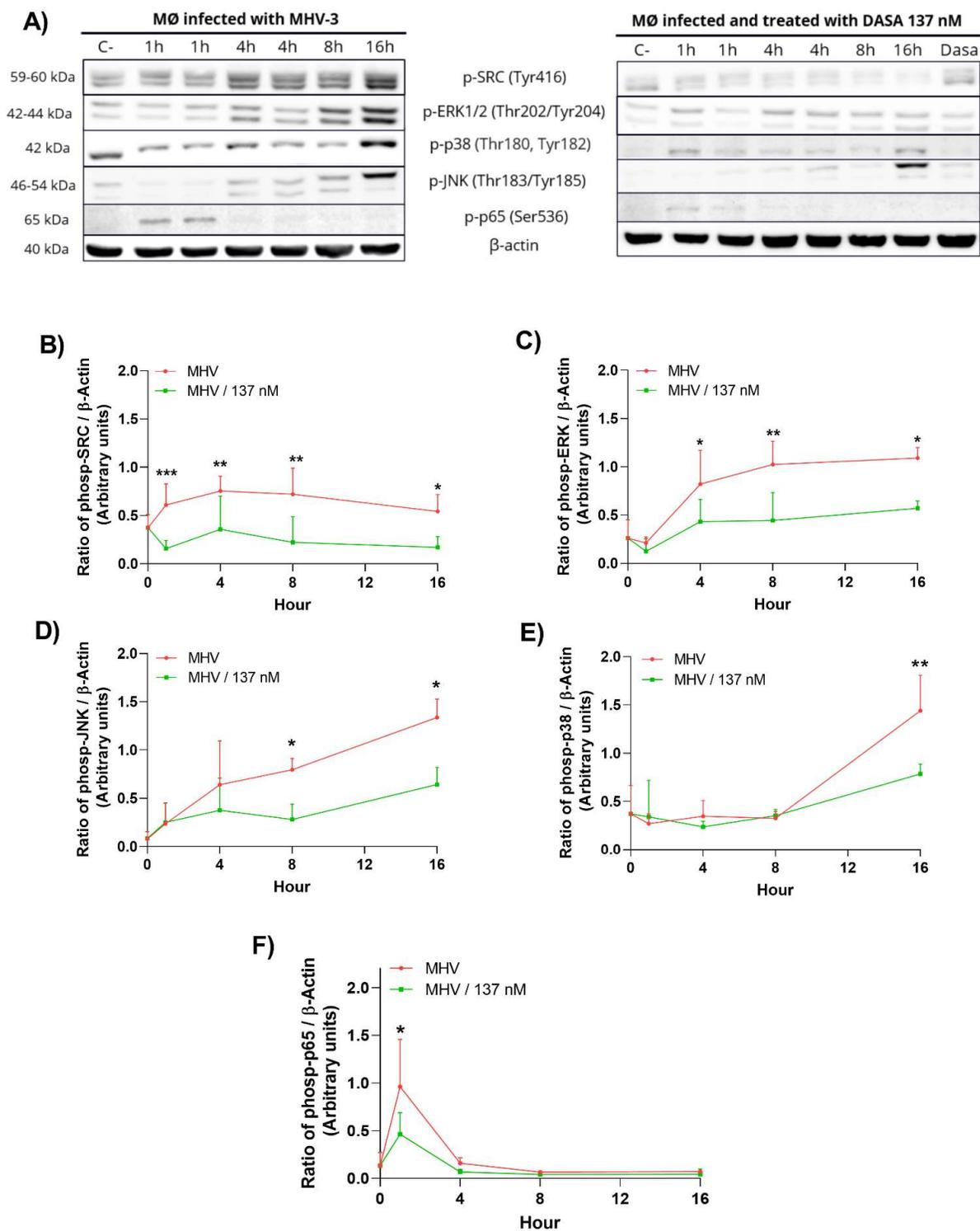


Fig. 16 Treatment post-infection with DASA promoted negative regulation of the SRC-MAPK-NF- κ B pathway. For analysis of protein expression in macrophages treated or not with DASA during MHV-3

infection, 40 µg of total protein were analyzed by Western blot using anti-p-SRC, anti-pERK1/2, anti-p-JNK, anti-p-p38, and anti-p-p65 antibodies and β-Actin as a loading control (A). Protein expressions in infected macrophages during infection indicated increased levels of activated p-SRC (B), p-ERK12 (C), p-JNK (D), p-p38 (E), and NF-κB p-p65 subunit (F) compared to infected macrophages treated with DASA in concentration of 137 nM. Results represent the mean and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. Differences between the control, infected, and/or infected-treated groups were assessed by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Data is presented as the mean ± SD (1 at 2 samples per group) from independent experiments performed in triplicate. *Significantly different ($p < 0.05$)

Discussion

Macrophages are versatile immune cells that can act as professional phagocytes, and antigen presentation [48]. They play essential roles in the immune response and defense against invading pathogens, including viruses [49]. However, they may be involved in pathological processes as inducers of tissue damage, including in viral infections [50]. During coronavirus infection, when infected, macrophages can contribute to viral dissemination. Additionally, macrophages can contribute to lung and systemic damage through the dysfunctional production of pro-inflammatory cytokines and chemokines [9]. Given the important role of macrophages in immune responses induced by coronavirus infection, targeted modulation of their functional activity and pro-inflammatory phenotype may offer a new therapeutic strategy for treating these infections. We investigated whether treatment with DASA could exhibit antiviral and/or anti-inflammatory effects on macrophages during MHV-3 infection. Our results demonstrated that pre-treatment and post-infection treatment of DASA exhibited antiviral effects against MHV-3, particularly in concentrations of 137 nM. Promising antiviral results have been reported with treatment using DASA and other tyrosine kinase inhibitors, highlighting their effects against infections caused by various viruses such as HIV, Dengue, Monkeypox, Hepatitis C virus, and respiratory viruses like betacoronaviruses such as MERS-CoV and SARS-CoV [15-21].

As obligate cellular parasites, viruses entirely depend on hijacking cellular processes, including host cell signaling and metabolism, to enhance their chances of survival, replication, and dissemination [27, 66]. To achieve this, various virus species can hijack signaling pathways associated with central physiological functions of the host cell to ensure viral replication demands are met and the viral cycle is completed [20]. Viruses can explore signaling pathways mediated by receptor tyrosine kinases such as the epidermal growth

factor receptor (EGFR) or non-receptor tyrosine kinases such as SRC to facilitate their entry into the host cell through actin cytoskeleton rearrangement [27]. Adsorption and internalization assays adapted from Pujol *et al.* (2012) [47] allow the evaluation of whether drug treatment interacts with receptors or other cellular proteins involved in virus entry, which could influence the virus's internalization into host cells. The results of adsorption and internalization assays revealed that pre-treatment with DASA was able to act on the early stages of the viral cycle by reducing the adsorption and entry of MHV-3 into macrophages, as evidenced by the decrease in viral titers.

Murine coronaviruses use the adhesion molecule CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-Cell Adhesion Molecule 1) as a receptor to enter the host cell, while human coronaviruses like SARS-CoV-2 require the ACE2 receptor (Angiotensin-Converting Enzyme 2) [5]. Coronaviruses can enter the host cell through plasma membrane fusion or utilize receptor-mediated endocytosis to enter via endosomes, depending on the cell or tissue type. Virions traffic to endosomes, then fuse with the endosomal membrane to deliver the genome to the host cell cytoplasm [67]. SRC is associated with actin cytoskeleton rearrangement and endosome formation [27], processes crucial for the internalization of coronavirus [67]. We hypothesize that treatment with DASA, by reducing SRC activity, may interfere with the endocytosis process and thus reduce the virus's entry via the endosome. A similar mechanism was observed in a study with the tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib, where pre-treatment with imatinib demonstrated antiviral activity against the betacoronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV *in vitro*. This effect was noted after internalization and endosomal trafficking, through the inhibition of virion fusion with the endosomal membrane by negatively modulating Abl2 expression, a kinase involved in the endosome maturation process [21].

SRC activation is an example of a signaling pathway exploited by different viruses to facilitate entry into host cells via endocytosis, including entry into cells such as macrophages [34]. Different viral species rely on non-receptor tyrosine kinase signaling, such as the SRC family, as critical mediators in various stages of viral infection within the host cell [29-34]. Influenza A viruses H1N1 and H3N2, Human Cytomegalovirus (HCMV), and Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) rely on SRC signaling to enter host cells [29, 31-32]. However, viruses like Ebola depend on SRC family kinase-mediated signaling to enter cells and release viral particles [67]. In addition to its contribution to virus entry and exit, SRC-mediated

signaling plays a crucial role in several stages of replication for various viral species such as Dengue, Chikungunya (CHIKV), Hepatitis C Virus (HCV), Ebola, and respiratory virus with Influenza and betacoronavirus MERS-CoV, particularly in stages involving transcription of viral genetic material and synthesis of structural proteins [31, 33, 68-70]. In this study, we observed that reduced activation of SRC due to the treatment with DASA affected the process of MHV-3 virus internalization in murine macrophages, representing an antiviral mechanism to be explored during coronavirus infection.

The Betacoronavirus MHV-3 is a model that mimics severe COVID-19 *in vivo* infections, causing pneumonia characterized by elevated levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF, IL-1 β , and chemokines, such as CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL5, in lung tissue; and often leading to death [51-52]. Similarly, during infections by other betacoronaviruses, such as SARS-CoV-2, increased levels of these pro-inflammatory mediators are observed, characteristic associated with a dysfunctional inflammation contributing to the severity of COVID-19. Initially, inflammation occurs in lung tissue, which can become systemic, consequently leading to multiple organ failure and death [53-54]. Interestingly, we observed that post-infection treatment with DASA at the same concentrations significantly reduced CXCL2 levels, restoring IL-6 and TNF to their baseline levels. Therefore, the reduction of these inflammatory mediators released by macrophages during DASA treatment may offer therapeutic benefits in coronavirus infection, as they play a significant role in maintaining the inflammatory response observed in severe COVID-19 cases.

Studies have shown that DASA treatment has promoted a shift from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory macrophage phenotype in the context of inflammatory diseases [36-38], including in the treatment of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and other lung injury conditions [38,40,55]. Although the reduction of the inflammatory response by TKIs, such as DASA, has been observed in these studies, the mechanisms by which these drugs act to reduce inflammation in the context of infections caused by betacoronaviruses are not fully understood. Therefore, we hypothesize that DASA treatment, by reducing the activation of the SRC tyrosine kinase, could affect downstream signaling pathways, including MAPK family proteins, related to the activation of the NF- κ B transcription factor responsible for the expression of genes involved in the inflammatory response. The SRC family kinases are responsible for the phosphorylation of proteins, a key regulatory mechanism that coordinates a variety of cellular responses, including inflammation [56].

When activated, SRC family kinases can phosphorylate many substrates [57], including MAPK family proteins, involved in activating the inflammatory response [58]. Thus, SRC may act as an upstream signaling mediator of MAPK protein activation [58].

The p38, JNK, and ERK proteins belong to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, a highly conserved signaling pathway in eukaryotes involved in signal transduction, that regulates physiological and pathophysiological cellular responses [59]. The MAPKs p38, JNK, and ERK are key effector components involved in the production of inflammatory mediators, including TNF, IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-8, CXCL1, and CXCL2, through the activation of different pro-inflammatory signaling pathways, including NF- κ B [60-64]. Downstream antagonism of these pathways through treatment with various therapeutic agents, including treatment with TKIs, is associated with reduced expression of pro-inflammatory cytokines, modulating to a non-inflammatory profile [63-65]. MAPKs can be activated by tyrosine kinases, such as SRC, which is responsible for activating several signaling cascades [57]. Thus, TKIs can inhibit the activity of these tyrosine kinases and consequently, include MAPK family proteins such as ERK, JNK, and p38 [66].

In this study, post-infection treatment with DASA, at a concentration of 137 nM, reduced SRC tyrosine kinase phosphorylation and consequently, negatively modulated the phosphorylation of MAPKs p-p38, p-JNK, and p-ERK1/2 kinases in MHV-3-infected macrophages. This reduced the activation of the NF- κ B p-p65 subunit, decreasing the release of the pro-inflammatory cytokines and chemokines analyzed. The findings of this study underscore the potential of repurposing the tyrosine kinase inhibitor DASA as an adjunctive treatment for betacoronavirus infections, demonstrating its ability to reduce MHV-3 virus replication and inflammatory mediator production in macrophages.

Conclusion

In conclusion, this study suggests that *in vitro* treatment with DASA exerts anti-inflammatory activity by reducing SRC signaling and downstream signaling pathways such as MAPK-NF- κ B, resulting in a significant decrease in pro-inflammatory cytokines and chemokines in macrophages infected with betacoronavirus MHV-3. Our results also suggest that the negative regulation of SRC-mediated signaling by DASA treatment affected the initial steps of viral replication, such as viral adsorption and endosomal internalization,

resulting in a significant decrease in viral titers. These results support the idea that cell signaling mediated by the SRC family is critical for the initial stage of the MHV-3 cycle in murine macrophages, making it a highly relevant area of study. Therefore, further studies are needed to reposition TKIs as an adjuvant therapeutic strategy for the treatment of coronavirus infections.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

The authors wish to thank the following funding sources: CAPES (0622/2020/88881.506612/2020-01, 88881.507175/2020-01 and 88881.506612/2020-0); Pró-Reitoria de Pesquisa - Universidade Federal de Minas Gerais; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (474528-2012-0; 483184-2011-0); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-01899-18; APQ-04900-22 091/2022 - PDPG III - Parcerias Estratégicas - Edital CAPES 38/2022; APQ-01523-24). This study was financed in part by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interação Microrganismo Hospedeiro (INCT – Dengue - CNPq, grant number 465425/2014-3 and FAPEMIG, grant number 25036/2014-3). Additional funding was provided by the Rede de Pesquisa em Imunobiológicos e Biofármacos para Terapias Avançadas e Inovadoras (ImunoBioFar) program, supported by FAPEMIG (grant numbers RED-00202-22, APQ29568-1, APQ-02618-23). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. DB and FMS are recipients of a CNPq fellowship.

References

- 1 Cui J, Li F, Shi Z-L (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17:181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

- 2 Boni MF, Lemey P, Jiang X, *et al* (2020) Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol.* 5:1408–1417. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>
- 3 Wang W, Lin XD, Zhang HL, *et al* (2020) Extensive genetic diversity and host range of rodent-borne coronaviruses. *Virus Evol.* 6. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa078>
- 4 Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF (2020) A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet.* 395:470-473. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9).
- 5 Koerner RW, Dijkman R, van der Hoek L (2020) Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2. *Viruses.* 12:880. <https://doi.org/10.3390/v12080880>
- 6 Cascella M, Rajnik M, Aleem A, *et al* (2020) Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). In *StatPearls*. Treasure Island.
- 7 Alimohamadi Y, Sepandi M, Kouchaki G (2020) Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 61(3), E304. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2020.61.3.1530>
- 8 Gomez-Escobar LG, González EM, Hernández AM, Martínez A (2021). Cytokine signatures of end organ injury in COVID-19. *Scientific Reports*, 11(1), 12606. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91859-z>
- 9 Sefik E, Qu R, Junqueira C, *et al* (2022) Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*, 606 (7914), 585–593. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>
- 10 Tregoning JS, Fielder H, *et al* (2021) Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nature Reviews Immunology*, 21(10), 626-636. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00592-1>
- 11 Wei CJ, Wang L *et al* (2020) Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(4), 239-252. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0056-x>
- 12 Namasivayam V, Palaniappan S, Vanangamudi, M (2022) Repurposing drugs targeting epidemic viruses. *Drug Discovery Today*, 27(7), 1874-1894. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.008>
- 13 Li G, Hilgenfeld R, Whitley R, *et al* (2023) Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. *Nat Rev Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00672-y>
- 14 Weisberg E, Parent A, Yang PL, *et al* (2020) Repurposing of kinase inhibitors for treatment of COVID-19. *Pharm Res.* 37:1-29. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02851-7>
- 15 Rodríguez-Mora S, Boudjelal M, Rivas R, *et al* (2024). Dasatinib interferes with HIV-1 proviral integration and the inflammatory potential of monocyte-derived macrophages from people with HIV. *Biochemical Pharmacology*, 116512. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116512>

- 16 De Wispelaere M, LaCroix AJ, Yang PL (2013) The small molecules AZD0530 and dasatinib inhibit dengue virus RNA replication via Fyn kinase. *J Virol* 87:7367–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.00632-13>
- 17 Reeves PM, Smith SK, Olson VA, Thorne SH, Bornmann W, Damon IK, et al (2011) Variola and monkeypox viruses utilize conserved mechanisms of virion motility and release that depend on abl and SRC family tyrosine kinases. *J Virol*. 85:21-31. <https://doi.org/10.1128/JVI.01814-10>
- 18 Min S, Kim S, Kim MJ, et al (2017) Abl tyrosine kinase regulates hepatitis C virus entry. *Front Microbiol* 8:1129. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01129>
- 19 Dyall J, Gross R, Kindrachuk J, et al (2014) Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 58:4885-4893. <https://doi.org/10.1128/aac.03036-14>
- 20 Sisk JM, Frieman MB, Machamer CE (2018) Coronavirus S protein-induced fusion is blocked prior to hemifusion by Abl kinase inhibitors. *J Gen Virol* 99:619. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001047>
- 21 Coleman CM, Sisk JM, Mingo RM, et al (2016) Abelson kinase inhibitors are potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus and Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion. *J Virol* 90:8924-8933. <https://doi.org/10.1128/jvi.01429-16>
- 22 Rabenau KE, Ruefli-Brasse AA, Graham TJ, et al (2014) Effectiveness of dasatinib in accelerated-phase chronic myeloid leukemia with p190 BCR-ABL1 and a second Philadelphia chromosome. *Cancer Genet* 207:109-110. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.02.006>
- 23 Zhang M, Sun Q, Zhang Y, et al (2020) Dasatinib inhibits lung cancer cell growth and patient-derived tumor growth in mice by targeting LIMK1. *Front Cell Dev Biol* 8:556532. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.556532>.
- 24 Fu Y, Zhang Y, Liang X, et al (2018) Dasatinib reduces 5-Fu-triggered apoptosis in colon carcinoma by directly modulating Src-dependent caspase-9 phosphorylation. *Cell Death Discov* 4:61. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0062-5>
- 25 Patterson H, Nibbs R, McInnes I, Siebert S (2014) Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol* 176(1):1-10. <https://doi.org/10.1111/cei.12115>
- 26 Hikita T, Ueda N, Eguchi K, et al (2019) Src in endosomal membranes promotes exosome secretion and tumor progression. *Scientific Reports*, 9:3265. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39795-4>
- 27 Pant A, Dsouza L, Yang Z (2021) Alteration in cellular signaling and metabolic reprogramming during viral infection. *MBio* 12(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.00635-21>
- 28 Bagnato G, Leopizzi M, Urciuoli E, Peruzzi B (2020) Nuclear functions of the tyrosine kinase Src. *Int. J. Mol. Sci* 21(8):2675. <https://doi.org/10.3390/ijms21082675>

- 29 Nogalski MT, Chan GCT, Stevenson EV, et al (2013) The HCMV gH/gL/UL128–131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes. *PLoS Pathog* 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003463>
- 30 Leite F, Way M (2015) The role of signalling and the cytoskeleton during Vaccinia Virus egress. *Virus Res.* 209:87-99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.024>
- 31 Kumar N, Sharma NR, Ly H, et al (2011) Receptor tyrosine kinase inhibitors that block replication of influenza A and other viruses. *Antimicrob. Agents Chemother* 55:5553-5559. <https://doi.org/10.1128/AAC.00725-11>
- 32 Ye C, Han X, Yu Z, et al (2017) Infectious bursal disease virus activates c-Src to promote $\alpha\beta 1$ integrin-dependent viral entry by modulating the downstream Akt-RhoA GTPase-actin rearrangement cascade. *J. Virol* 91(3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01891-16>
- 33 Broeckel R, Sarkar S, May NA, et al (2019) Src family kinase inhibitors block translation of alphavirus subgenomic mRNAs. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2019) 63(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02325-18>
- 34 Shi Q, Zhao R, Chen L, et al (2024) Newcastle disease virus activates diverse signaling pathways via Src to facilitate virus entry into host macrophages. *J. Virol* e01915-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.01915-23>
- 35 Ryu KY, Cho GS, Park MJ, et al (2019) Dasatinib regulates LPS-induced microglial and astrocytic neuroinflammatory responses by inhibiting AKT/STAT3 signaling. *J Neuroinflammation* 16:36. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1561-x>
- 36 Ozanne J, Prescott AR, Clark K (2015) The clinically approved drugs dasatinib and bosutinib induce anti-inflammatory macrophages by inhibiting the salt-inducible kinases. *Biochem. J.* 465(2):271-279. <https://doi.org/10.1042/BJ20141165>
- 37 Vakilzadeh H, Pourbagheri-Sigaroodi A, Safaroghli-Azar A, et al (2023) Smart redox-sensitive micelles based on chitosan for dasatinib delivery in suppressing inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Macromol* 229:696-712. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.111>
- 38 Cruz FF, Horta LFB, Maia LA, et al (2016) Dasatinib reduces lung inflammation and fibrosis in acute experimental silicosis. *PLoS ONE* 11(1) . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147005>
- 39 Guo K, Bu X, Yang C, et al (2019) Treatment effects of the second-generation tyrosine kinase inhibitor dasatinib on autoimmune arthritis. *Front. Immunol.* 9:3133. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03133>
- 40 Liu Z, Chen S, Zhang X, et al (2021) Dasatinib protects against acute respiratory distress syndrome via Nrf2-regulated M2 macrophages polarization. *Drug Dev. Res* 82(8):1247-1257. <https://doi.org/10.1002/ddr.21839>
- 41 Khajah MA, Fateel MJ, Ananthalakshmi KV, Luqmani YA (2016) Anti-inflammatory action of angiotensin 1-7 in experimental colitis. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150861>

- 42 Byeon SE, Yi YS, Oh J, et al (2012) The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2012:512926. <https://doi.org/10.1155/2012/512926>
- 43 Braicu C, Buse M, Busuioc C, et al (2019) A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer. *Cancers* 11:1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- 44 Nie Y, Wang P, Li X, et al (2023) SARS-CoV-2 ORF3a positively regulates NF- κ B activity by enhancing IKK β -NEMO interaction. *Virus Res.* (2023) 328:199086. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199086>
- 45 Kircheis R, Schuster M, Planz O (2020) NF- κ B pathway as a potential target for treatment of critical stage COVID-19 patients. *Front Immunol.* (2020) 11:598444. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.598444>
- 46 Maza PK, Bonfim-Melo A, Padovan ACB, et al (2017) *Candida albicans*: the ability to invade epithelial cells and survive under oxidative stress is unlinked to hyphal length. *Front. Microbiol* 8:1235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01235>
- 47 Pujol CA, Ray S, Ray B, Damonte EB (2012) Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol* 51(4):412-416. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.028>
- 48 Chen S, Zhang X, Wang Y, Li Z, Liu Z (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8:207. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01052-2>.
- 49 Yu, S, Zhang Y, Zhang C, et al (2022). Modulation of macrophage polarization by viruses: turning off/on host antiviral responses. *Frontiers in Microbiology*, 13, 839585. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.839585>
- 50 Reece MD, Taylor RR, Song C, Gavegnano C (2021) Targeting macrophage dysregulation for viral infections: Novel targets for immunomodulators. *Front. Immunol* 12:768695. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.620510>
- 51 Andrade ACDSP, Campolina-Silva GH, Queiroz-Junior C M et al (2021) A biosafety level 2 mouse model for studying betacoronavirus-induced acute lung damage and systemic manifestations. *J. Virol* 95(22). <https://doi.org/10.1128/JVI.01276-21>
- 52 Pereira RD, Rabelo RAN, Oliveira NFM, et al (2023) A 5-Lipoxygenase Inhibitor, Zileuton, Modulates Host Immune Responses and Improves Lung Function in a Model of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Induced by Betacoronavirus. *Viruses* 15(10):2049. <https://doi.org/10.3390/v15102049>
- 53 Gomez-Escobar LG, Hoffman KL, Choi JJ et al (2021) Cytokine signatures of end organ injury in COVID-19. *Sci. Rep* 11(1):12606. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91859-z>
- 54 Queiroz MAF, Neves PFM, Lima SS, et al (2022) Cytokine profiles associated with acute COVID-19 and long COVID-19 syndrome. *Front. Cell. Infect. Microbiol* 12:922422. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.922422>

- 55 Pan Y, Ikoma K, Matsui R, et al (2023) Dasatinib suppresses particulate-induced pyroptosis and acute lung inflammation. *Front. Pharmacol.* 14:1250383. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1250383>
- 56 Bhanumathy KK, Balagopal A, Vizeacomar FS, et al (2021) Protein tyrosine kinases: their roles and their targeting in leukemia. *Cancers* 13(2):184. <https://doi.org/10.3390/cancers13020184>
- 57 Pelaz SG, Tabernero A (2022) Src: coordinating metabolism in cancer. *Oncogene* 41(45):4917-4928. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02487-4>
- 58 Jang EJ, Jeong HO, Park D, et al (2015) Src tyrosine kinase activation by 4-hydroxynonenal upregulates p38, ERK/AP-1 signaling and COX-2 expression in YPEN-1 cells. *PLoS ONE* 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129244>
- 59 Soares-Silva M, Diniz FF, Gomes GN, et al (2016) *et al.* The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway: role in immune evasion by trypanosomatids. *Front. Microbiol.* 7:183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>
- 60 Canovas B, Nebreda AR (2021) Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22(5):346-366. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00322-3>
- 61 Zhao J, et al. (2016) The c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway is activated in human interstitial cystitis (IC) and rat protamine sulfate induced cystitis. *Sci. Rep.* 6:19670. <https://doi.org/10.1038/srep19670>
- 62 Lucas RM, Luo L, Stow JL (2022) ERK1/2 in immune signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 50(5):1341-1352. <https://doi.org/10.1042/BST20220484>
- 63 Ganguly P, Macleod T, Wong C, et al (2023) Revisiting p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) in inflammatory arthritis: a narrative of the emergence of MAPK-Activated Protein kinase inhibitors (MK2i). *Pharmaceutics* 16(9):1286. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091286>
- 64 Zhong R, Miao L, Zhang H, et al (2022) Anti-inflammatory activity of flavonols via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 macrophages. *Curr. Res. Food Sci* 5:1176-1184. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.07.003>
- 65 Li X, Xu M, Shen J, et al (2022) Sorafenib inhibits LPS-induced inflammation by regulating Lyn-MAPK-NF- κ B/AP-1 pathway and TLR4 expression. *Cell Death Discov* 8(1):281. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00545-x>
- 66 Boulant S, Stanifer M, Lozach PY (2015) Dynamics of virus-receptor interactions in virus binding, signaling, and endocytosis. *Viruses*. 7(6):2794-2815. <https://doi.org/10.3390/v7062747>
- 67 Burkard, C, Verheije MH, Van-Kuppeveld, FJM (2014) Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 10(11), e1004502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
- 68 Furuyama W, Marzi A, Carmody AB et al (2016) Fc γ -receptor IIa-mediated Src signaling pathway is essential for the antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *PLoS Pathog* 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006139>

- 69 Shin JS, Jung E, Kim M, et al (2018) Saracatinib inhibits Middle East respiratory syndrome-coronavirus replication *in vitro*. *Viruses* 10(6):283. <https://doi.org/10.3390/v10060283>
- 70 Klinker S, Stindt S, Gremer L, et al (2019) Phosphorylated tyrosine 93 of hepatitis C virus nonstructural protein 5A is essential for interaction with host c-Src and efficient viral replication. *J. Biol. Chem.* 294(18):7388-7402. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007656>

5.2 Capítulo 2 - Efeitos do tratamento com Atorvastatina em linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectadas com MHV-3

Para avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos antivirais e anti-inflamatório da atorvastatina durante a infecção pelo vírus MHV-3 em linhagem celular de macrófagos, foram realizados ensaios para análise da citotoxicidade com diferentes concentrações do fármaco para definir as melhores concentrações para o profilático e tratamento terapêutico. Portanto, os macrófagos foram tratados com concentrações de 5, 7, 10, 20 e 40 μM da atorvastatina.

De acordo com os resultados do ensaio de citotoxicidade, as concentrações de 5 μM a 20 μM não afetaram a viabilidade dos macrófagos após 16 horas de tratamento, em comparação com o grupo controle. Contudo, o tratamento com a concentração de 40 μM resultou em uma redução significativa da viabilidade celular (Figura 17 A, B).

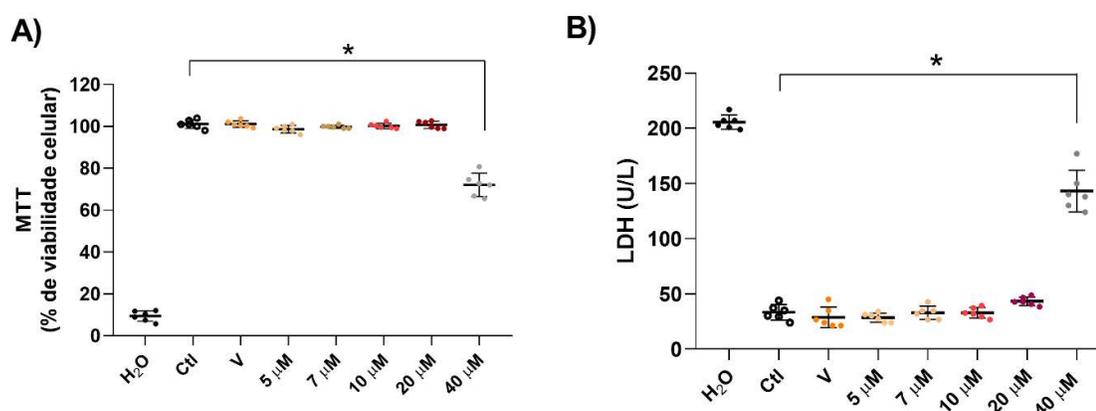


Figura 17. Ensaio de citotoxicidade do tratamento com a atorvastatina em macrófagos murinos. (A) Análise por ensaio de MTT da citotoxicidade nas concentrações de 5, 7, 10 e 20 μM da atorvastatina. **(B)** Análise de morte celular por meio do ensaio de LDH durante o tratamento com as concentrações de 5, 7, 10 e 20 μM de atorvastatina. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois experimentos independentes, n=6. One-way ANOVA com o teste Turkey's multiple comparisons; * $P < 0.05$.

Em uma abordagem profilática, após 16 horas de pré-tratamento com atorvastatina nas concentrações de 10 μM e 20 μM , ambas as concentrações protegeram os macrófagos da infecção pelo vírus MHV-3. Em contraste, os macrófagos não tratados e infectados pelo MHV-3, na ausência ou presença do veículo (DMSO 0,002%), apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular, conforme evidenciado pelos ensaios de MTT e LDH (Figura 18 A, B).

Posteriormente, avaliamos se o tratamento prévio com as diferentes concentrações da atorvastatina poderia demonstrar um efeito antiviral durante a infecção dos macrófagos com o vírus MHV-3. A análise dos títulos virais de MHV-3 por meio da contagem de UFP demonstrou que o tratamento prévio por 16 horas com a atorvastatina reduziu significativamente o título viral no sobrenadante dos macrófagos em 1,1 log para o pré-tratamento na concentração de 10 μM e redução de 1,5 log para o pré-tratamento a 20 μM (Figura 18 C).

Avaliamos se o tratamento prévio com as diferentes concentrações poderia apresentar efeito anti-inflamatórios nos macrófagos durante a infecção com o vírus. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com a atorvastatina nas concentrações de 10 e 20 μM promoveram a redução significativa dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF, com exceção dos níveis da quimiocina CXCL2. Além disso, observamos que o tratamento com a concentração de 20 μM promoveu uma redução mais acentuada nos níveis de IL-6 e TNF de forma dose-dependente, quando comparado ao tratamento com 10 μM , na presença do vírus MHV-3 (Figura 18 D, E, F).

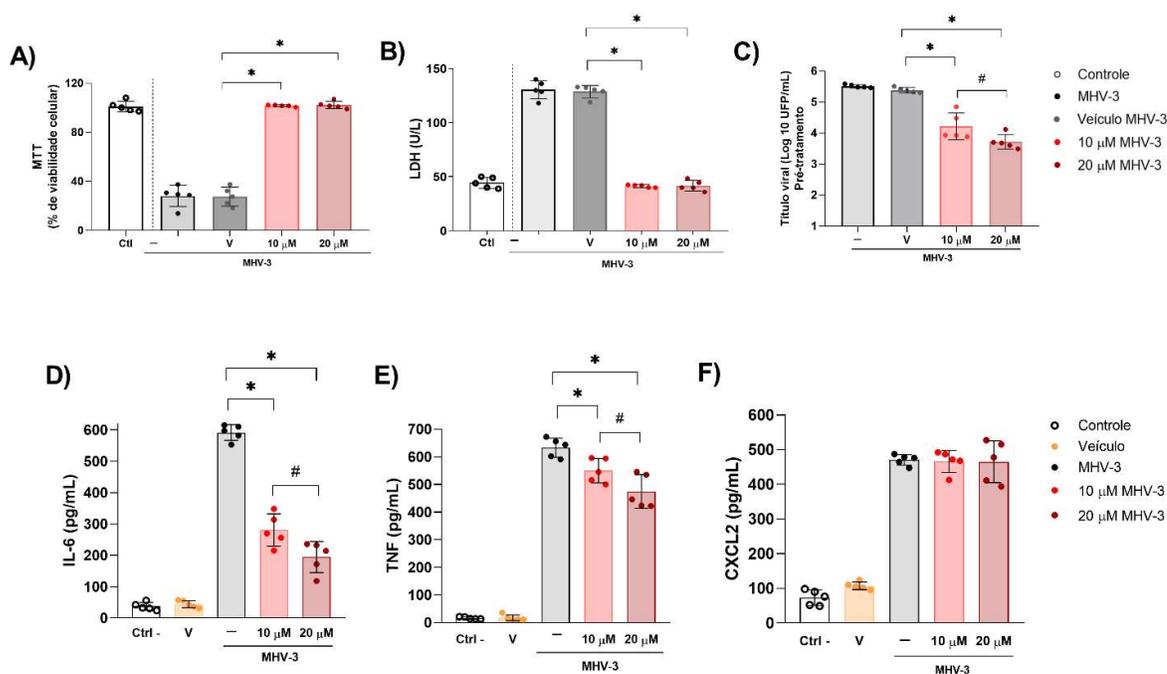


Figura 18. Efeito profilático do tratamento com a atorvastatina em macrófagos durante a infecção com o vírus MHV-3. (A) Análise da viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 por meio de ensaio de MTT após tratamento profilático nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina e infecção pelo vírus MHV-3 em comparação aos macrófagos infectados com MHV-3 e não tratados, na presença ou ausência do veículo (DMSO a 0,1%). (B) A morte celular foi analisada medindo a liberação de LDH no sobrenadante dos macrófagos tratados previamente nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina em comparação com os macrófagos infectados com MHV-3 e não tratados, na presença ou ausência do veículo (DMSO a 0,1%). (C) Contagem de UFP do vírus MHV-3 após tratamento prévio dos macrófagos por 16 horas nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina e infecção. (D) Níveis das citocinas IL-6, (E) TNF e, (F) CXCL2 no sobrenadante dos macrófagos tratados previamente nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina e infecção. Os dados são apresentados como a média ± SD de três experimentos independentes, n=4-6. One-way ANOVA com o teste Tukey's multiple comparisons, *, # $P < 0.05$.

Ensaio de adsorção e internalização viral foram conduzidos para investigar o papel da atorvastatina nas etapas iniciais do ciclo de replicação do vírus MHV-3. Os resultados mostraram que o tratamento nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina promoveram a redução significativa dos títulos virais na etapa de adsorção viral com redução da escala logarítmica de 0,2 log e 0,4 log, respectivamente. De modo interessante, no ensaio de internalização, a redução dos títulos virais foi mais acentuada com a concentração de 20 μM, resultando em uma diminuição de 1,2 log na escala logarítmica, enquanto o tratamento na concentração de 10 μM reduziu 0,8 log do título viral (Figura 19 A, B).

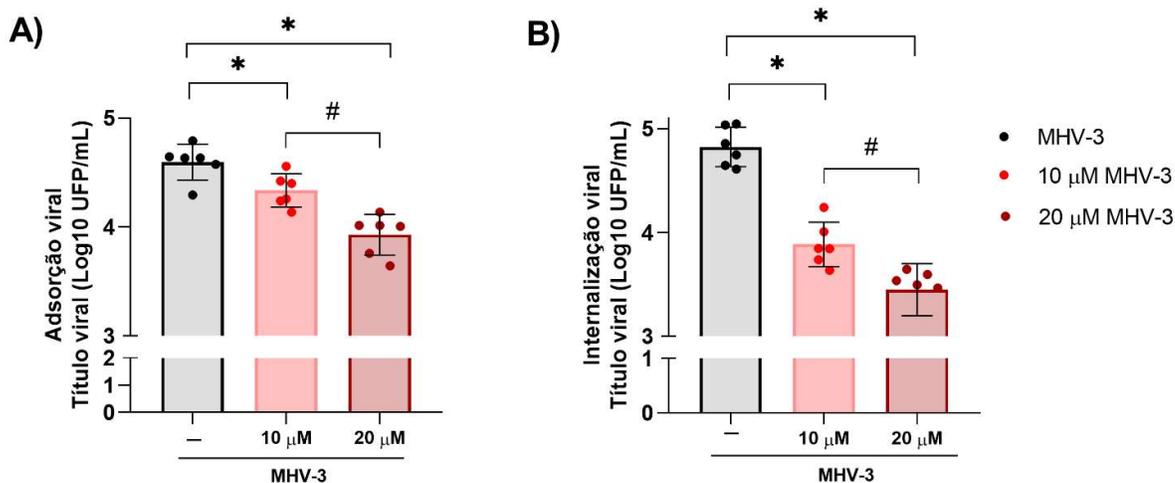


Figura 19. O tratamento com atorvastatina reduz os títulos virais do MHV-3 durante os estágios iniciais do ciclo viral. (A) Macrófagos foram tratados com dasatinibe nas concentrações de 10 e 20 μM do fármaco na presença do vírus MHV-3 na MOI de 0,01 a 4°C por 1 hora para o ensaio de adsorção viral (B) e a 4°C por 1 hora seguido de 1 hora a 37°C para o ensaio de internalização viral. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por one-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD de experimentos independentes realizados em duplicata, $n=6$. *, # $P < 0,05$).

DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 2

O fármaco atorvastatina é caracterizado por sua amplitude de atividades farmacológicas. Além da principal atividade hipolipemiante, a atorvastatina apresenta propriedades anti-inflamatórias, antiviral, antioxidante e imunomoduladora, que podem contribuir para benefícios terapêuticos no contexto de infecções virais respiratórias, incluindo a COVID-19 (De Jesús-González *et al.*, 2024; He *et al.*, 2023; Sadeghi *et al.*, 2024). E esse papel terapêutico das estatinas durante a COVID-19 tem sido relatado por diferentes estudos retrospectivos observacionais, os quais sugerem que o uso dessas drogas pode estar associado à redução da gravidade da doença e melhores desfechos clínicos (Zhang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021; Kouhpeikar *et al.*, 2022).

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com atorvastatina na linhagem celular RAW 264.7 durante a infecção pelo MHV-3, um modelo experimental que emula características da COVID-19 grave em camundongos, apresentou efeitos profiláticos e protegeu os macrófagos da infecção pelo vírus. Na análise da contagem de UFP no

sobrenadante, observamos que o tratamento prévio com o fármaco nas concentrações de 10 e 20 μM reduziu significativamente os títulos virais. Com destaque para o tratamento na concentração de 20 μM , que apresentou uma redução dose-dependente nos títulos virais.

O papel antiviral das estatinas, incluindo a atorvastatina, tem sido demonstrado durante a infecção por diferentes vírus de RNA, como o vírus Ebola (Shrivastava-Ranjan *et al.*, 2018), membros da família *Flaviviridae* incluindo os vírus da Dengue (Martínez-Gutierrez *et al.*, 2011, 2014), Zika (Españo *et al.*, 2019) e febre amarela (Osuna-Ramos *et al.*, 2023), além de vírus respiratórios como o vírus Influenza (Episcopio *et al.*, 2019) vírus sincicial respiratório (Malhi *et al.*, 2021), incluindo o vírus SARS-CoV-2 (Teixeira *et al.*, 2022). Esses estudos têm identificado diferentes mecanismos antivirais das estatinas sobre a replicação viral, incluindo a inibição do processamento da glicoproteína de superfície viral (Shrivastava-Ranjan *et al.*, 2018), a redução da formação de gotículas lipídicas (Episcopio *et al.*, 2019), a inibição da prenilação da Rho GTPases e do tráfego de vesículas (Martínez-Gutierrez *et al.*, 2011; Malhi *et al.*, 2021), e a alteração do conteúdo lipídico da membrana da célula hospedeira, principalmente em regiões denominadas balsas lipídicas, afetando os níveis de expressão e localização de moléculas, incluindo receptores celulares como o ECA2 (Teixeira *et al.*, 2022).

Alguns desses mecanismos antivirais estão intimamente relacionados ao papel das estatinas na inibição da via do mevalonato, incluindo metabólitos lipídicos dessa via, como o colesterol e os isoprenoides, que foram identificados como fatores críticos do hospedeiro para a replicação viral (Zhang *et al.*, 2019). As estatinas, ao inibirem a síntese do mevalonato, reduzem tanto os níveis intracelulares de colesterol, essencial para o ciclo de vida viral, quanto a disponibilidade de isoprenoides, moléculas envolvidas na prenilação de várias proteínas, incluindo pequenas GTPases (Rho, Ras, Rac, Rab, entre outras). A prenilação de proteínas, que consiste na adição de grupos lipídicos hidrofóbicos a proteínas, e está envolvida em vários processos relacionados ao ciclo de vida viral, como a regulação da endocitose de partículas virais e a via da autofagia (Gorabi *et al.*, 2020). A inibição da síntese de isoprenoides pelas estatinas reduz a ativação de GTPases como Rho, resultando na diminuição da endocitose viral, incluindo de vírus como os coronavírus (Hou *et al.*, 2022). A GTPase Rho regula a polaridade e a motilidade celular por meio de seus efeitos no citoesqueleto, no tráfego de membranas e na adesão celular (Gorabi *et al.*, 2020). No entanto, evidências crescentes mostram que muitos vírus, incluindo os coronavírus evoluíram

diversas interações com a sinalização das GTPases Rho e as manipulam em benefício próprio principalmente em processos de pré-entrada e endocitose (Hou *et al.*, 2022).

Durante a infecção, os vírus podem induzir a célula hospedeira a gerar grandes quantidades de gotículas lipídicas, que servem como precursores dos componentes lipídicos do vírus. As gotículas lipídicas são organelas com monocamadas fosfolipídicas que envolvem lipídios, incluindo triacilglicerídeos, ésteres de colesterol e ésteres de esteróis. Essas organelas são produzidas sob várias circunstâncias, principalmente para o armazenamento de gordura e regulação do metabolismo de células eucarióticas, além de servirem como uma plataforma para a montagem e replicação viral (Episcopio *et al.*, 2019; Palacios-Rápalo *et al.*, 2021), incluindo os vírus de RNA de fita positiva, como é o caso dos betacoronavírus MHV e SARS-CoV-2 (Li *et al.*, 2007; Palacios-Rápalo *et al.*, 2021).

Na membrana da célula hospedeira há regiões ricas em lipídeos, denominadas balsas lipídicas que são microdomínios de membrana enriquecidos em colesterol e glicoesfingolipídeos, que concentram uma variedade de moléculas, incluindo receptores e co-receptores. Essas regiões ricas em colesterol servem como plataformas para a localização de moléculas e da maquinaria de endocitose da célula, facilitando a fusão do vírus com as membranas das células hospedeiras, promovendo uma entrada viral eficiente (Theken *et al.*, 2021; Palacios-Rápalo *et al.*, 2021). Além disso, o colesterol presente nas balsas lipídicas é indispensável para a internalização, entrada, montagem e liberação dos coronavírus (Proto *et al.*, 2021). O colesterol presente na membrana da célula hospedeira é capaz de aumentar a fluidez da membrana e promover uma curvatura negativa crítica para a fusão viral (Zhang *et al.*, 2019).

A modulação mediada pelas estatinas na síntese de colesterol, formação de isoprenoides, prenilação de proteínas, autofagia proviral e formação de gotículas lipídicas culmina na inibição de vias relacionadas à resposta pró-inflamatória, incluindo a via NF- κ B, que é ativada durante a infecção viral (Gorabi *et al.*, 2020). Desse modo, além de seu papel antiviral por meio da modulação do metabolismo lipídico, as estatinas podem neutralizar infecções virais por meio de seus efeitos anti-inflamatórios (Proto *et al.*, 2021).

Nesse contexto, resolvemos investigar se o tratamento com a atorvastatina poderia exercer efeito anti-inflamatório nos macrófagos durante a infecção pelo vírus MHV-3. Ao analisar os níveis dos mediadores pró-inflamatórios, observamos que o tratamento nas concentrações de 10 e 20 μ M da atorvastatina promoveu a redução das citocinas IL-6 e TNF, com exceção da quimiocina CXCL2. Além disso, a redução de IL-6 e TNF foi dose

dependente, com uma maior diminuição durante o tratamento com a concentração de 20 μM do fármaco. Esses mediadores pró-inflamatórios são considerados como alguns dos marcadores de gravidade da doença em paciente com COVID-19 (Gomez-Escobar *et al.*, 2021).

Estudos tem demonstrado que o tratamento com atorvastatina consegue regular negativamente as vias pró-inflamatórias mediadas por NLRP3 e NF- κB reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-8 e TNF (González-Herrera *et al.*, 2023; Yue *et al.*, 2023). Além disso, estudos retrospectivos observacionais observaram que os pacientes com comorbidades e que já faziam o uso de estatinas, durante a COVID-19 apresentaram níveis significativamente reduzidos da citocina IL-6 e uma menor contagem de neutrófilos circulantes comparados aos pacientes com COVID-19 que não faziam uso de estatinas (Zhang *et al.*, 2020). Esses pacientes também apresentavam níveis mais baixos de proteína C reativa (Zhang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021). O uso prévio de estatinas por esses pacientes com comorbidades durante a COVID-19 foi associado a uma redução significativa nas chances de mortalidade intra-hospitalar (Zhang *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2021; Kouhpeikar *et al.*, 2022). Desse modo, essas evidências forneceram uma base para explorar o papel terapêutico das estatinas na COVID-19.

Com base nas evidências de que as estatinas podem interferir nos estágios iniciais da replicação de vírus, buscamos investigar se o tratamento nas concentrações de 10 e 20 μM da atorvastatina poderia afetar as etapas de adsorção e internalização do vírus MHV-3 em macrófagos murinos, adaptado de Pujol e colaboradores (2012). Esses ensaios permitem avaliar se o tratamento com o fármaco pode interagir com receptores ou outras proteínas celulares envolvidas na entrada do vírus, o que poderia influenciar nos processos de adsorção e internalização do vírus nas células hospedeiras. Curiosamente, nossos resultados revelaram que o tratamento com atorvastatina levou a uma redução significativa na adsorção e internalização viral, com destaque para o tratamento na concentração de 20 μM que demonstrou uma redução dose-dependente nos títulos virais. Portanto, esses achados sugerem que a atorvastatina interfere nas etapas iniciais do ciclo do vírus MHV-3, particularmente durante sua entrada nos macrófagos, ao alterar regiões da membrana envolvidas em processos dependentes de lipídios, como o colesterol, que desempenham um papel crucial na organização das balsas lipídicas e na interação vírus-hospedeiro.

O estudo de Teixeira e colaboradores (2022), investigaram o mecanismo pelo qual o tratamento com a estatina sinvastatina poderia interferir na replicação do vírus SARS-CoV-

2 em linhagem celular Calu-3. Para isso, avaliaram a localização subcelular do receptor ECA2 durante a infecção e tratamento com a sinvastatina. Foi observado que o tratamento com a sinvastatina inibiu a ligação e a entrada do SARS-CoV-2 na célula ao perturbar o ambiente lipídico da estrutura das balsas lipídicas na membrana plasmática, alterando a localização e resultando na internalização do ECA2 na bicamada lipídica, impedindo a interação adequada do receptor com o vírus.

Em conjunto, nossos resultados demonstraram o efeito profilático do tratamento com atorvastatina em um modelo *in vitro* durante a infecção pelo vírus MHV-3. Observamos que o tratamento prévio com atorvastatina apresentou efeitos antivirais e anti-inflamatórios, além de interferir nas etapas iniciais do ciclo viral, evidenciado pela redução na adsorção e internalização viral. Assim, nossos achados reforçam o potencial do reposicionamento da atorvastatina como um agente terapêutico no tratamento de infecções por coronavírus.

5.3 Capítulo 3- Efeitos do tratamento com resveratrol na linhagem de macrófagos RAW 264.7 infectada com MHV-3 e MHV-A59, e em modelo murino de obesidade e infecção.

Inicialmente realizamos a padronização da infecção *in vitro* pelo vírus MHV-A59. Diferentemente da linhagem MHV-3, a linhagem A59 possui um tropismo pulmonar, com cronicidade na cinética da infecção.

Na infecção por MHV-A59, foi observada uma redução significativa da viabilidade celular somente a partir do tempo de 8 horas para as MOIs de 1 e 0.1 em comparação ao controle negativo. No tempo de 16 horas ocorreu uma diminuição da viabilidade celular para as MOIs de 1 (67%), 0.1 (50%), 0.01 (36%) e 0.001 (26%) comparadas ao grupo controle. Após 24 horas de infecção a redução da viabilidade celular foi semelhante para todas as MOIs analisadas (Figura 20 A). Os resultados observados no ensaio de LDH nos tempos avaliados corrobora aos observados no ensaio de MTT, onde foi observada uma maior redução da viabilidade celular no tempo de 16 horas (Figura 20 B). A análise dos títulos virais revelou que o pico da infecção pelo vírus MHV-A59 em macrófagos murinos ocorreu nesse no tempo de 16 horas (Figura 20 C).

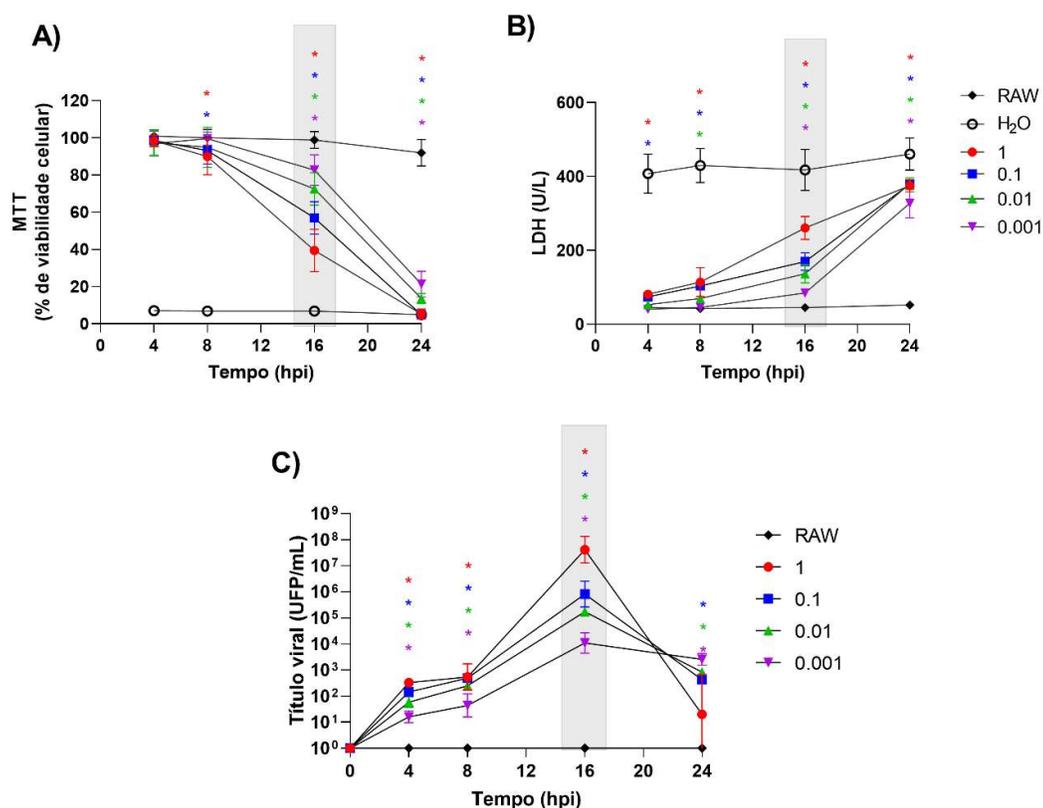


Figura 20. Padronização da infecção por MHV-A59 em linhagem celular RAW 264.7. (A) Análise da viabilidade celular por ensaio de MTT após 4, 8, 16 e 24 horas após infecção com as MOI's de 1; 0.1; 0.01 e 0.001 do vírus MHV-A59. (B) Análise da viabilidade celular por ensaio de LDH após 4, 8, 16 e 24 horas após infecção com as MOI's de 1; 0.1; 0.01 e 0.001 do vírus MHV-3. A diminuição da viabilidade celular com a infecção pelas MOI's do vírus foram comparadas ao controle negativo. (C) Avaliação do título viral do sobrenadante coletado após 4, 8, 16 e 24 horas após infecção com as MOI's de 1; 0.1; 0.01 e 0.001 do vírus MHV-A59. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois experimentos independentes, $n=5$. One-way ANOVA com o teste Turkey's multiple comparisons; * $p < 0.05$.

Com base nos resultados dos ensaios de MTT, LDH e titulação viral, os experimentos subsequentes foram realizados no tempo de 16 horas para avaliar os efeitos profiláticos ou terapêuticos do tratamento com resveratrol durante a infecção pelo MHV-3 e MHV-A59 em macrófagos murinos.

Posteriormente, avaliamos a citotoxicidade de diferentes concentrações do resveratrol nos macrófagos murino. No ensaio de MTT, os tratamentos nas concentrações de 20 μ M, 50 μ M e 80 μ M não afetaram a viabilidade celular dos macrófagos. Entretanto, os tratamentos nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M promoveram uma redução da viabilidade dos macrófagos de 9% e 21%, respectivamente. Ao analisar a atividade de LDH no sobrenadante, resultados semelhantes aos encontrados no ensaio de MTT foram

encontrados, com uma maior redução da viabilidade celular durante o tratamento nas concentrações de 100 μM e 200 μM (Figura 21 A, B).

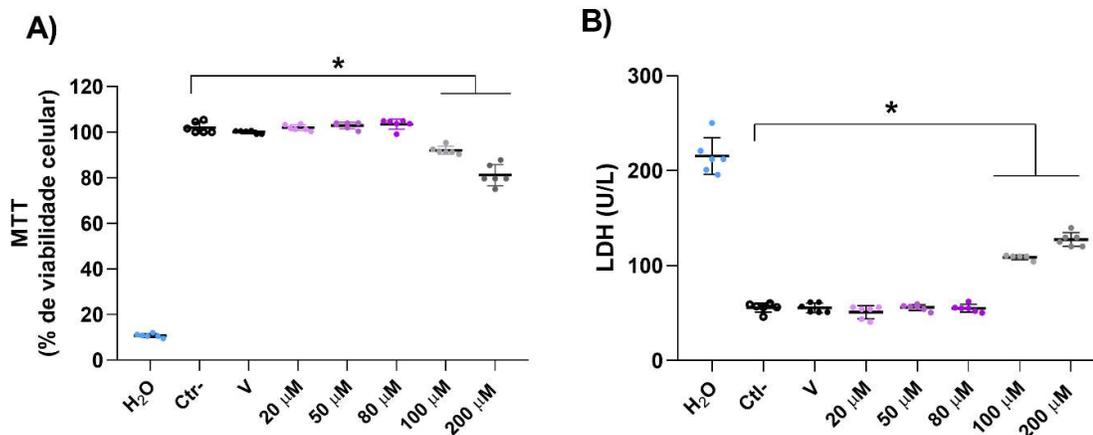


Figura 21. Ensaio de citotoxicidade do resveratrol em macrófagos murinos. (A) Análise da citotoxicidade das concentrações de 20, 50, 80, 100 e 200 μM do Resveratrol por meio do ensaio de MTT. (B) Análise da viabilidade celular por meio de ensaio de LDH durante tratamento com as concentrações da droga. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois experimentos, $n=6$. One-way ANOVA com o teste Turkey's multiple comparisons; * $P < 0.05$

Para investigar se o resveratrol nas concentrações de 50 μM e 80 μM poderia ser empregado em uma abordagem profilática (pré-tratamento) ou terapêutica (pós-infecção), os diferentes tratamentos foram conduzidos ao longo de 16 horas na presença dos vírus MHV-3 ou MHV-A59. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por meio dos ensaios de MTT e LDH.

O tratamento prévio com resveratrol, em ambas as concentrações utilizadas, demonstraram um efeito profilático e protegeram os macrófagos da infecção com MHV-3, ao contrário do grupo de macrófagos não tratados e infectados com o MHV-3, na ausência ou presença do veículo, que apresentaram uma redução significativa da viabilidade celular tanto nos ensaios de MTT quanto nos ensaios de LDH (Figura 22 A, B). Semelhante aos achados nos ensaios com MHV-3, o tratamento prévio com ambas as concentrações do resveratrol também protegeu os macrófagos da infecção pelo MHV-A59 em comparação aos grupos controles infectados, como observado nos ensaios de MTT e LDH (Figura 22 C, D).

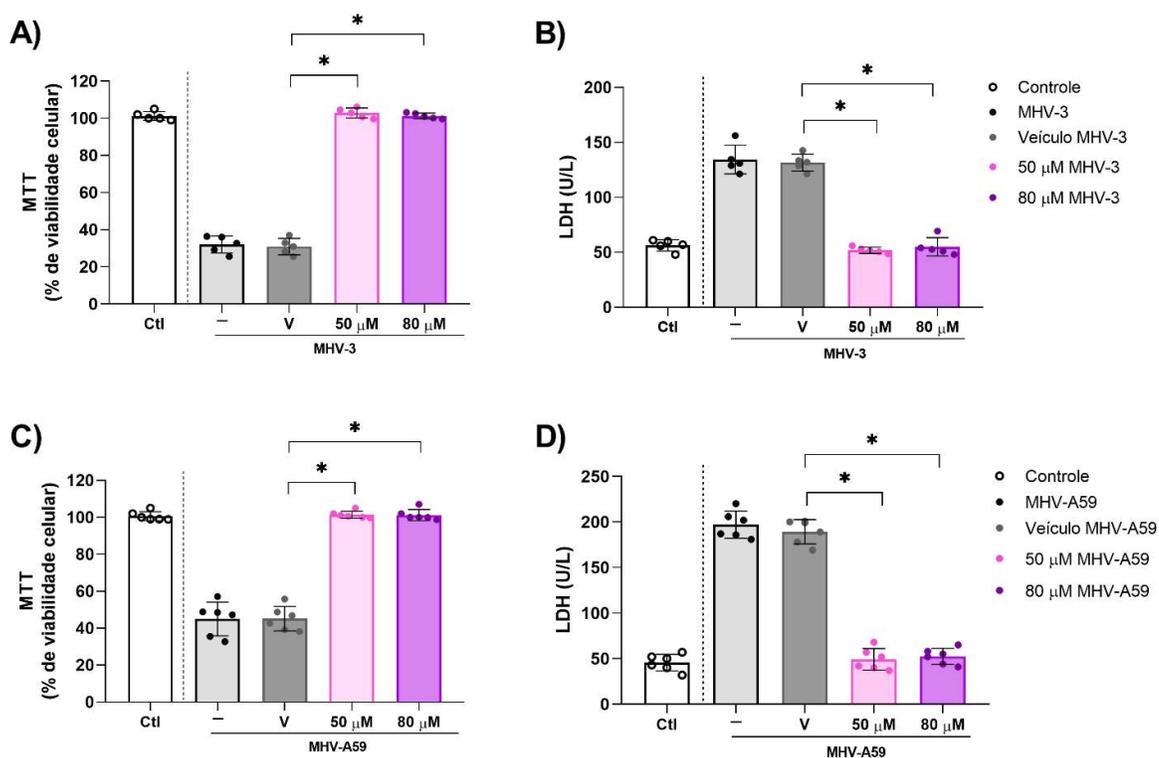


Figura 22. Efeitos profiláticos do resveratrol em macrófagos infectados com diferentes betacoronavírus murinos. (A,C) O tratamento prévio nas concentrações de 50 e 80 μ M de resveratrol protegeu os macrófagos mostrando um efeito profilático durante a infecção pelos vírus MHV-3 e MHV-A59 em comparação aos macrófagos infectados com MHV-3 ou MHV-A59 não tratados, na presença ou não do veículo (DMSO a 0,05%) conforme o ensaio de MTT. (B-D) A avaliação da morte celular através da liberação de LDH no sobrenadante dos macrófagos pré-tratados com resveratrol nas concentrações de 50 e 80 μ M durante infecção pelos vírus MHV-3 ou MHV-A59 também confirmou a proteção dos macrófagos em comparação aos grupos infectados não tratados. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois ou três experimentos independentes, $n=5-6$. One-way ANOVA com o teste Tukey's multiple comparisons; *, $P < 0.05$.

Os tratamentos com resveratrol pós-infecção nas concentrações de 50 e 80 μ M demonstraram efeito terapêutico e foram capazes de proteger os macrófagos na presença do vírus MHV-3 em comparação ao grupo infectado e grupo veículo infectado, como observado nos ensaios de MTT e LDH (Figura 23 A, B). Na infecção pelo vírus MHV-A59, observamos resultados semelhantes, em que o tratamento pós-infecção, nas concentrações de 50 e 80 μ M, apresentou efeitos terapêuticos e protegeu os macrófagos, em comparação ao grupo infectado e não tratado, como demonstrado nos ensaios de MTT e LDH (Figura 23 C, D).

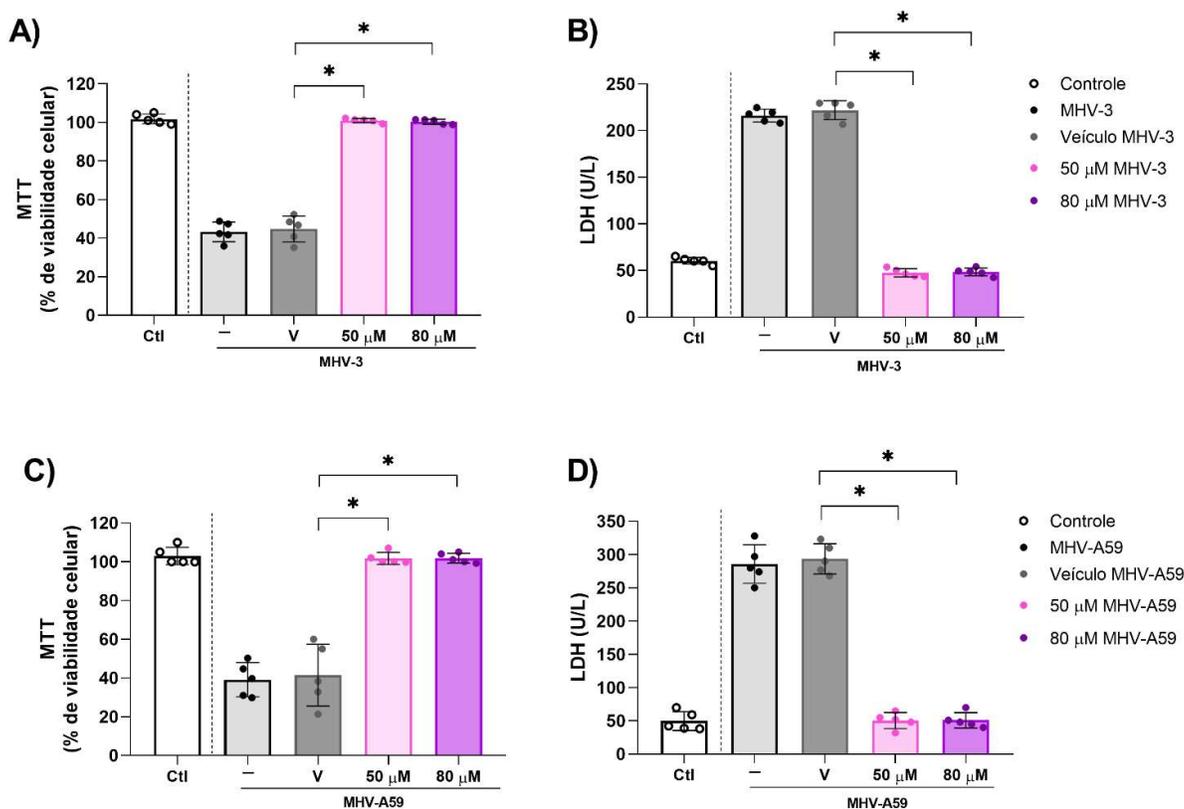


Figura 23. Efeitos terapêuticos do resveratrol em macrófagos pós-infecção com diferentes betacoronavírus murinos. (A,C) Nos ensaios de MTT e (B,D) LDH, o tratamento pós-infecção nas concentrações de 50 e 80 μ M de resveratrol demonstrou efeitos terapêuticos ao proteger os macrófagos durante a infecção pelos vírus MHV-3 e MHV-A59 em comparação aos grupos infectados não tratados. No grupo veículo infectado, os macrófagos foram mantidos na presença de DMSO a 0,05%, concentração final correspondente à diluição da droga. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois experimentos independentes, n=5. One-way ANOVA com o teste Tukey's multiple comparisons; *,# $P < 0.05$.

O pré-tratamento nas concentrações de 50 e 80 μ M do resveratrol reduziu significativamente o título do vírus MHV-3 no sobrenadante, com uma redução na escala logarítmica de 0,8log e 1,2 log, respectivamente. De modo interessante, o tratamento pós-infecção na concentração de 80 μ M de resveratrol promoveu uma maior redução do título viral em comparação ao tratamento na concentração de 50 μ M, observado pela diminuição na escala logarítmica de 2 logs do vírus MHV-3, enquanto o tratamento com 50 μ M reduziu 1 log do título do vírus em comparação aos grupos infectados não tratados (Figura 24 A, B). Durante a infecção com MHV-A59 o tratamento prévio com ambas as concentrações da droga reduziu os títulos virais em 1,4 e 1,7 log da escala logarítmica, respectivamente. No

entanto, o tratamento pós-infecção na concentração de 80 μM do resveratrol demonstrou ter um efeito antiviral maior, visto pela redução de 2,7 log da escala logarítmica, comparado ao grupo tratado na concentração de 50 μM que reduziu 1,5 log e grupos infectados não tratados (Figura 24 C, D).

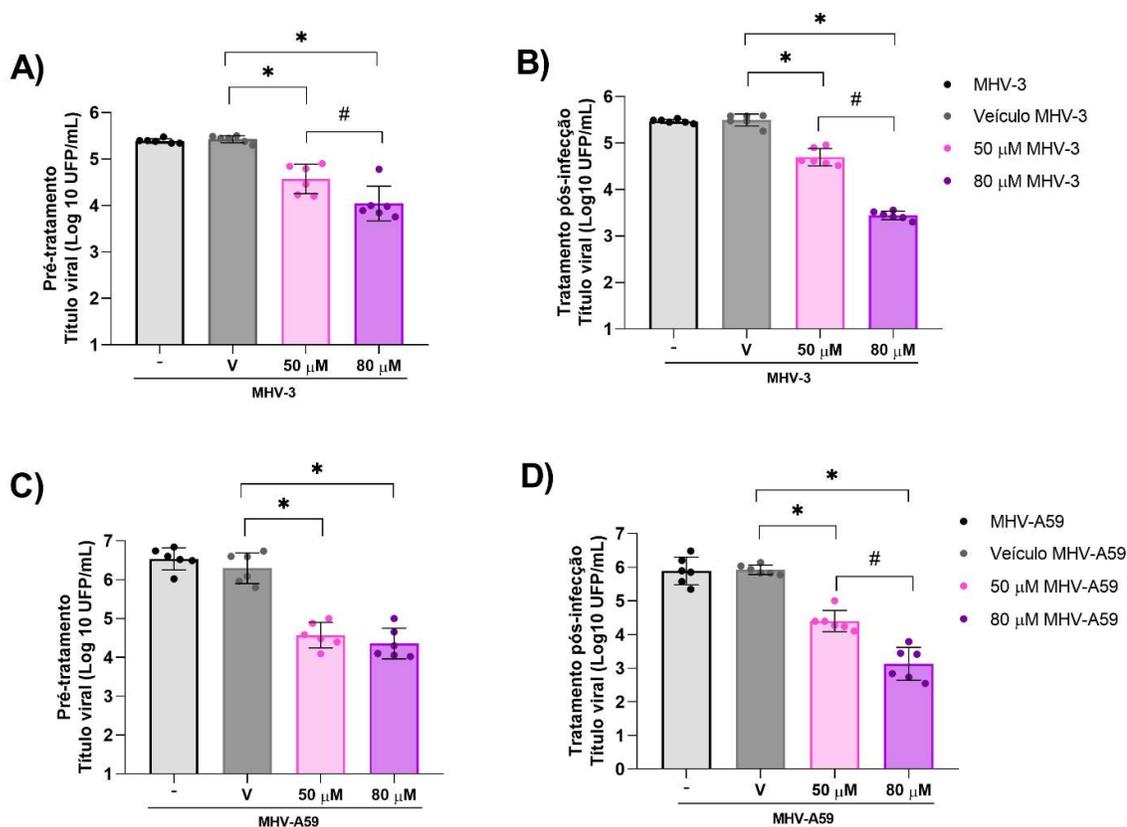


Figura 24. Efeitos antivirais do pré-tratamento e tratamento pós-infecção com o resveratrol durante infecção por diferentes betacoronavírus murinos. (A) Pré-tratamento nas concentrações de 50 e 80 μM do resveratrol durante 16 horas reduz os títulos virais no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com MHV-3. **(B)** Tratamento pós-infecção nas concentrações de 50 e 80 μM do resveratrol promove redução dos títulos virais no sobrenadante dos macrófagos infectados. Os dados são apresentados como a média \pm SD de dois ou três experimentos independentes, $n=6$. One-way ANOVA com o teste Tukey's multiple comparisons; *,# $P < 0.05$.

Investigamos os possíveis efeitos anti-inflamatórios do resveratrol durante a infecção por coronavírus murinos. O pré-tratamento com resveratrol na concentração de 50 μM reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF, bem como da quimiocina

CXCL2, no sobrenadante de macrófagos infectados com MHV-3, em comparação ao grupo infectado e não tratado. Já o pré-tratamento com 80 μ M resultou em uma redução significativa dos níveis de IL-6, com destaque para uma maior diminuição de TNF e CXCL2, tanto em relação ao tratamento com 50 μ M quanto ao grupo infectado e não tratado. Além disso, o tratamento com resveratrol após a infecção, em ambas as concentrações avaliadas, reduziu os níveis de IL-6, TNF e CXCL2 no sobrenadante em comparação ao grupo infectado e não tratado (Figura 25 A).

Durante a infecção pelo vírus MHV-A59, o pré-tratamento com 50 μ M de resveratrol reduziu os níveis de TNF e CXCL2. Por sua vez, o pré-tratamento com 80 μ M promoveu uma redução ainda mais pronunciada de CXCL2, além de diminuir os níveis de TNF, em comparação ao tratamento com 50 μ M e ao grupo infectado não tratado. Já na infecção por MHV-A59, o tratamento pós-infecção com resveratrol na concentração de 50 μ M reduziu os níveis de TNF e CXCL2. Notavelmente, o tratamento na concentração de 80 μ M não apenas reduziu os níveis de TNF, mas também promoveu uma redução mais acentuada dos níveis de CXCL2 em comparação ao tratamento com 50 μ M e ao grupo infectado e não tratado (Figura 25 B).

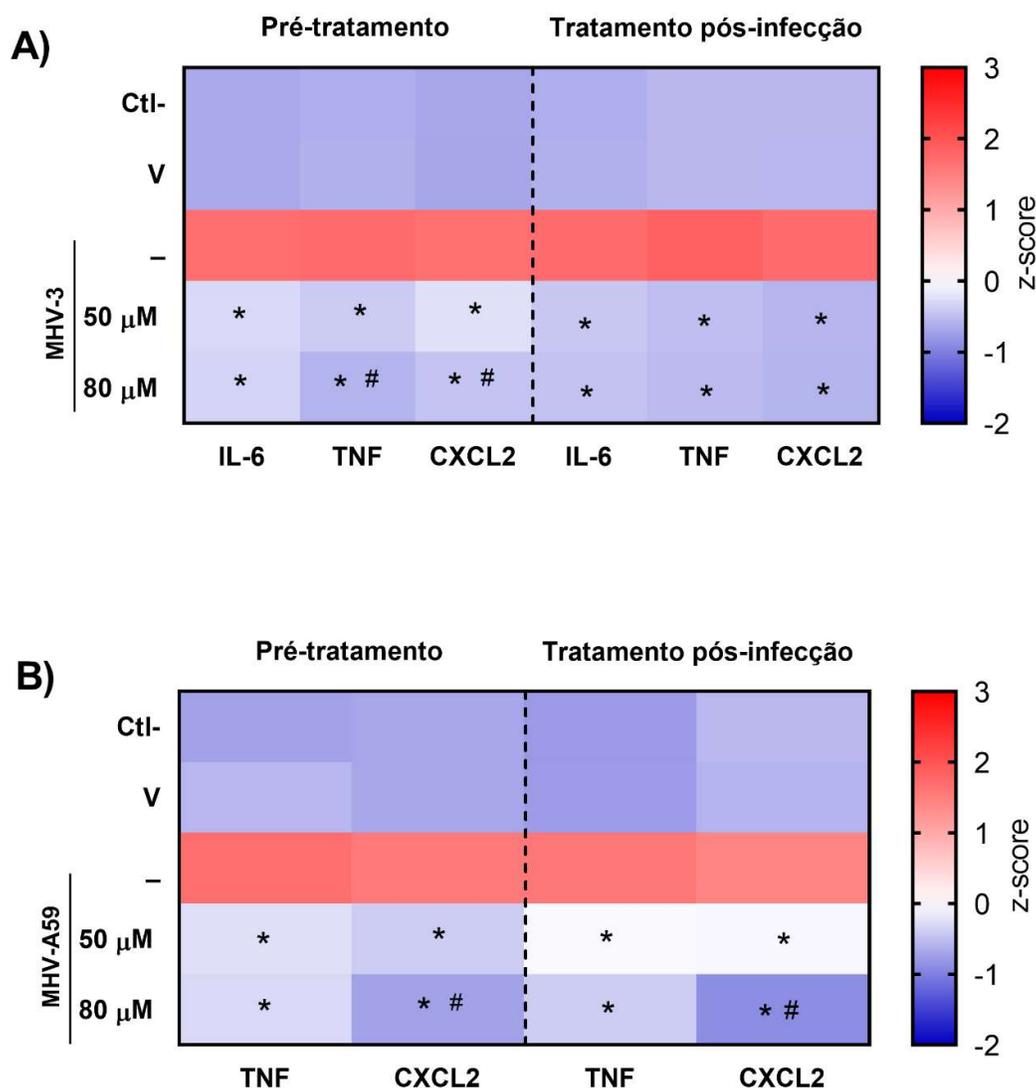


Figura 25. Tratamento com resveratrol reduz os níveis dos mediadores pró-inflamatórios durante o infecção com diferentes betacoronavírus murinos. (A-B) O tratamento prévio com resveratrol ou o tratamento pós-infecção nas concentrações de 50 e 80 μ M de resveratrol reduziu os níveis das citocinas IL-6, TNF e quimiocinas CXCL2 e CXCL1 na presença dos vírus MHV-3 ou MHV-A59 em macrófagos murinos. * Diferença entre os grupos MHV e tratamentos a 50 ou 80 μ M do resveratrol na presença dos vírus MHV-3 ou MHV-A59. # Diferença entre os tratamentos a 50 e 80 μ M do resveratrol na presença dos vírus MHV-3 ou MHV-A59. Os dados são apresentados como a média \pm SD, n=5-6. One-way ANOVA com o teste Tukey's multiple comparisons; *,# $P < 0.05$.

O vírus MHV-3 é um modelo experimental que mimetiza a COVID-19 grave em camundongos causando um quadro clínico semelhante a SARS, inflamação e pneumonia

aguda e lesões pulmonares graves. A infecção por MHV-3 além de comprometer os pulmões, é caracterizada por ser uma infecção politrópica, na qual pode se tornar sistêmica e afetar outros órgãos como o fígado, baço, coração, rins e cérebro (Andrade *et al.*, 2021). Em contrapartida, a linhagem MHV-A59 é um vírus com um tropismo maior pelo pulmão, causando uma infecção mais branda e menos letal, podendo resultar em danos pulmonares, e, ocasionalmente danos hepáticos e neuronais (Yang *et al.*, 2014). Portanto, optamos por dar prosseguimento aos experimentos subsequentes *in vivo* utilizando somente o vírus MHV-A59 para infecção dos animais com obesidade induzida por dieta de cafeteria, uma vez que a obesidade representa uma comorbidade.

Para analisar os efeitos do tratamento com resveratrol em um modelo de comorbidade durante a infecção pelo vírus MHV-A59, camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 7 a 8 semanas de idade, foram inicialmente submetidos a dieta de cafeteria e água contendo açúcar (CAF) ou dieta convencional e com água sem açúcar (DC), durante 4 semanas (Figura 26 A). Ao longo das quatro semanas, foi realizada a pesagem dos animais submetidos à dieta as diferentes dietas para analisar o ganho de peso. Durante as quatro semanas os animais alimentados com a dieta CAF consumiram uma maior quantidade de ração e ingeriram uma maior quantidade de água com açúcar comparado aos animais alimentados com a dieta DC e ingestão de água sem açúcar (Figura 26 B, C). Além disso, os animais CAF, durante as quatro semanas de dieta, apresentaram um maior ganho de peso e índice de adiposidade comparado aos animais DC (Figura 26 D, E). Os animais CAF também apresentaram níveis plasmáticos aumentados de glicose, colesterol total e triglicérides em comparação aos animais DC, após as quatro semanas na dieta (Figura 26 F, G, H).

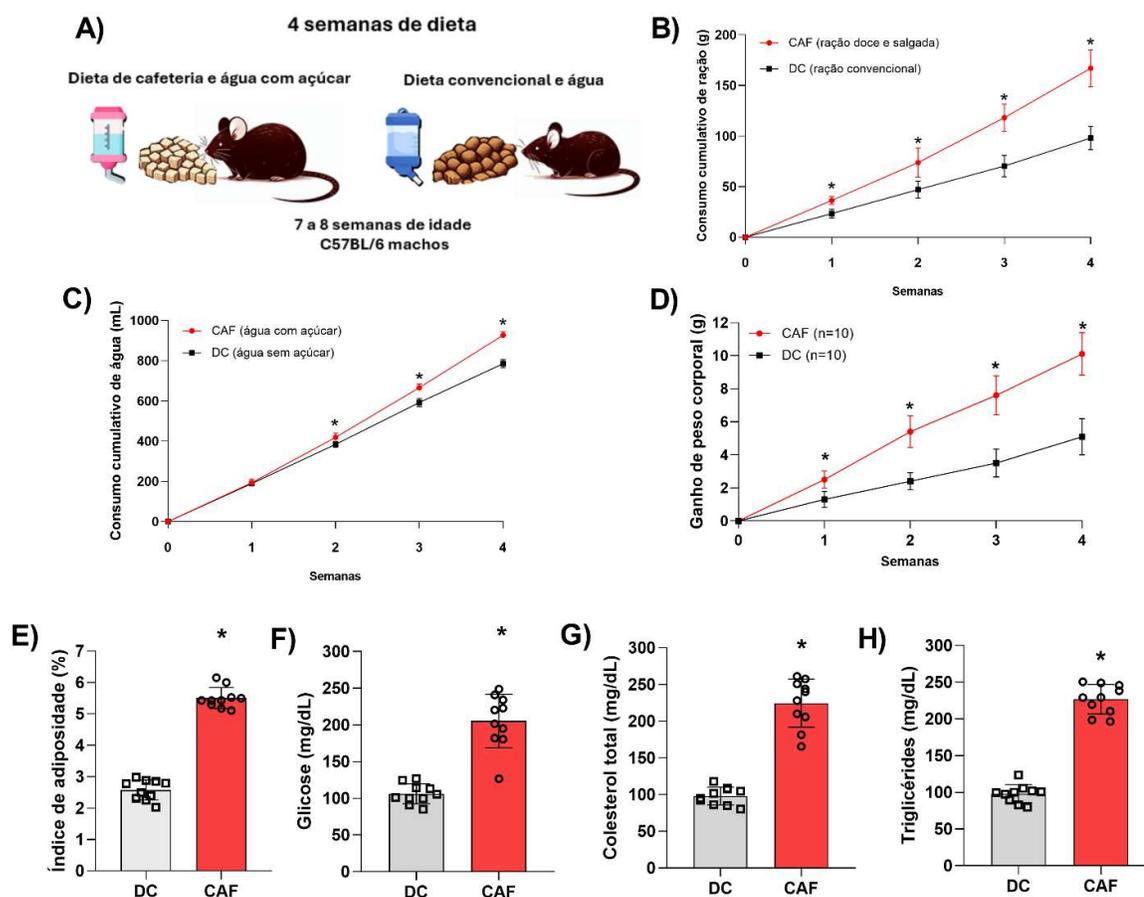


Figura 26. Estabelecimento do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria. (A) Esquema representativo do período da dieta. (B) Consumo cumulativo de ração de cafeteria e convencional em gramas (C) Consumo de água com ou sem açúcar em mililitros. (D) Ganho de peso durante o período da dieta. (E) Índice de adiposidade dos animais dos grupos dieta de cafeteria (CAF) e dieta convencional (DC), calculado com base na razão entre o peso dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico e o peso total corporal dos animais. (F) Níveis plasmáticos de glicose, (G) colesterol total e (H) triglicérides em animais CAF e DC após quatro semanas de dieta. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Sidak's (B-D). Para o gráfico E foi realizado o Teste t. Os dados são apresentados como média \pm SD, n=10. ns, não significativo. *Representa uma diferença significativa ($p < 0,05$).

5.3.1 O tratamento com resveratrol demonstrou efeitos protetores nos animais com obesidade na infecção com MHV-A59

Os resultados da letalidade com o vírus MHV-A59 demonstraram que os animais CAF infectados apresentaram uma pontuação maior no escore clínico em comparação aos animais do grupo DC infectados, indicando que o ganho de peso devido à obesidade é um

fator complicador durante a infecção pelo vírus MHV-A59, resultando em uma forma mais grave da doença nesses animais. No entanto, o tratamento com resveratrol promoveu uma redução significativa da pontuação do escore clínico tanto nos animais do grupo CAF quanto nos animais do grupo DC durante a infecção com o vírus (Figura 27 A). Além disso, os animais CAF apresentaram uma maior perda de peso comparado aos animais DC durante a infecção com o MHV-A59. Apesar do tratamento com resveratrol reduzir a gravidade da doença ele não interferiu na perda dos animais CAF durante a infecção. Entretanto, os animais DC durante a infecção e tratamento com resveratrol apresentaram uma menor perda de peso em comparação aos animais CAF infectados e tratados (Figura 27 B).

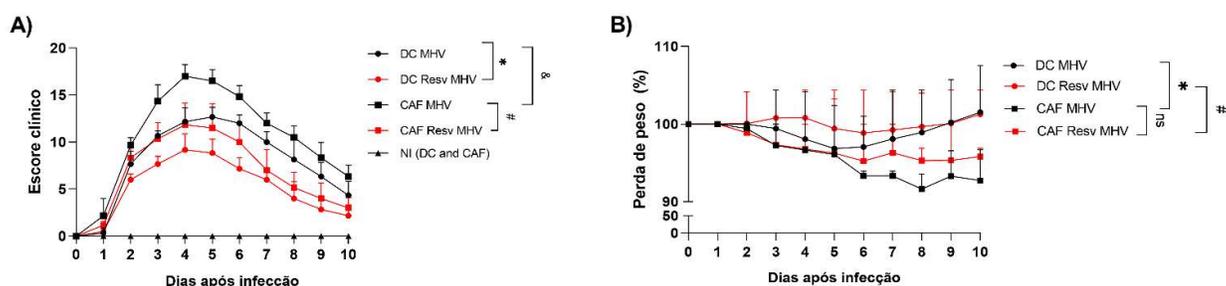


Figura 27. Tratamento com resveratrol protege os animais com obesidade durante a infecção com MHV-A59. (A) O tratamento com resveratrol (50 mg/kg/dia) melhora o escore clínico e **(B)** reduz a perda de peso em animais obesos durante a infecção por MHV-A59. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey ou o teste de comparações múltiplas Sidak's. Os dados são apresentados como média \pm SD, n=7-8. *, #, & Representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.3.2 Resveratrol atenuou a patogênese pulmonar e a inflamação induzida por MHV-A59 em animais com obesidade

Considerando que o tratamento *in vitro* com resveratrol protegeu os macrófagos murinos durante a infecção pelo MHV-A59, buscamos avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol no tecido pulmonar de animais com obesidade e infectados com um inóculo de 3×10^5 PFU do vírus MHV-A59. Nossos resultados revelaram que no 2 dpi os animais CAF infectados e não tratados apresentaram uma maior pontuação do escore histopatológico no pulmão, indicando uma maior gravidade das lesões pulmonares nesses animais comparados aos animais do grupo DC infectados e não tratados. Entretanto, no 2 dpi, o tratamento com resveratrol não reverteu o quadro de lesão pulmonar nos animais CAF e nos animais DC

durante a infecção pelo vírus (Figura 28 A, B). Além disso, no 2 dpi os títulos virais no pulmão dos animais CAF infectados e não tratados foram significativamente maiores que os encontrados nos pulmões dos animais DC durante infecção. No entanto, o tratamento com resveratrol reduziu significativamente os títulos virais no 2 dpi tanto nos pulmões dos animais CAF quanto dos animais do grupo controle durante a infecção em comparação aos animais CAF e animais DC infectados e não tratados (Figura 28 C).

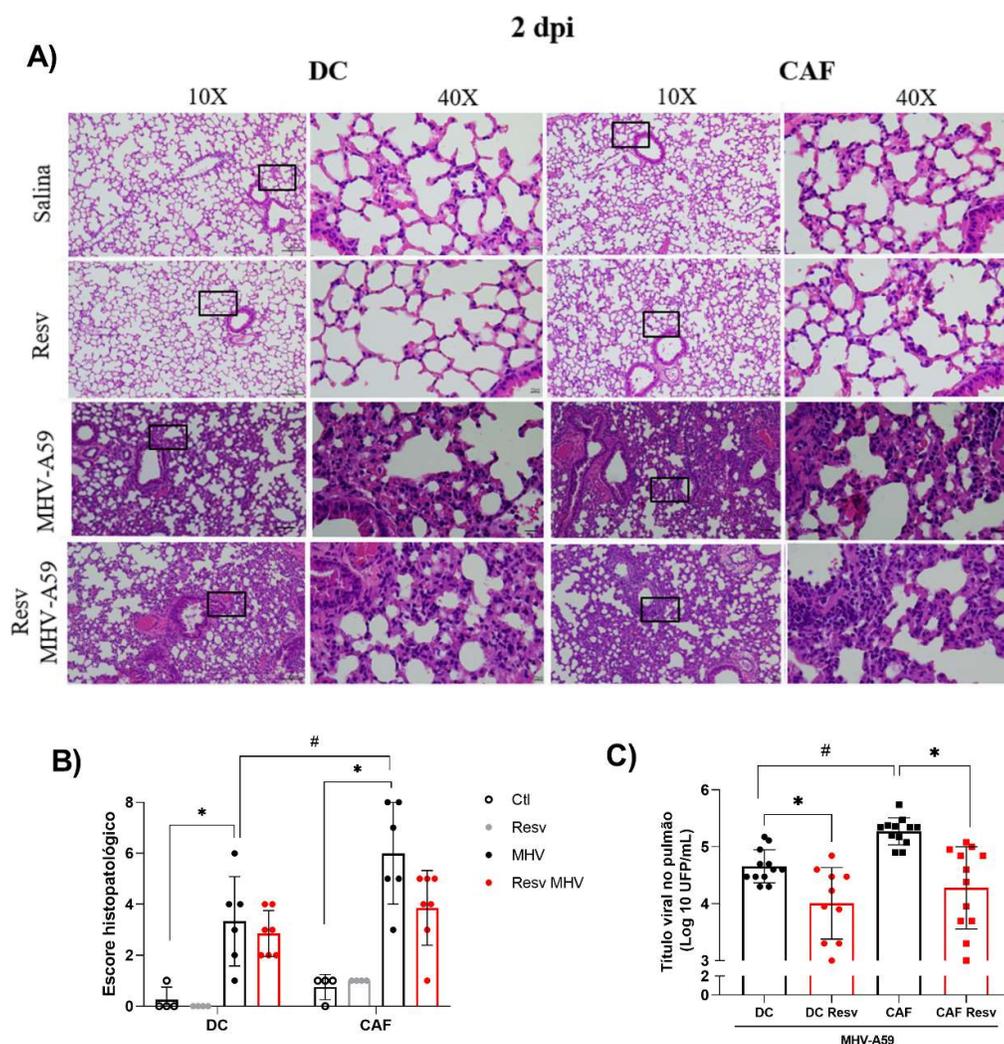


Figura 28. O tratamento com resveratrol reduz a carga viral no pulmão de animais com obesidades. (A) Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de seções pulmonares (n = 4-8) no segundo dia pós-infecção (2 dpi.) dos animais do grupo dieta de cafeteria (CAF) e dieta convencional (DC) infectados ou não com MHV-A59 (3×10^5 PFU) e tratados ou não com resveratrol (50mg/kg/dia). Barras de escala de 10 e 100 μ m. **(C)** Título viral no pulmão dos animais CAF e controle no 2º dpi após infecção com MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações

múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD. *, # Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

No 5 dpi, a análise do escore histopatológico revelou que o tratamento com o resveratrol reduziu os danos pulmonares nos animais CAF durante a infecção com MHV-A59 comparado aos animais CAF infectados e não tratados. Contudo, nos animais DC, o tratamento com resveratrol não promoveu a redução do dano pulmonar durante a infecção com o vírus. Além disso, ao analisar a contagem de UFP no 5 dpi não foram detectados títulos virais no pulmão dos animais do grupo CAF e animais do grupo DC (Figura 29 A, B).

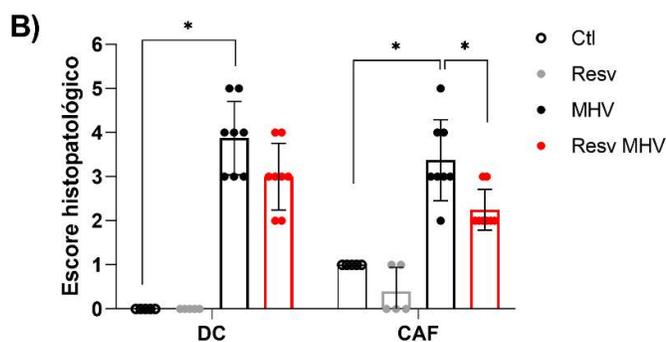
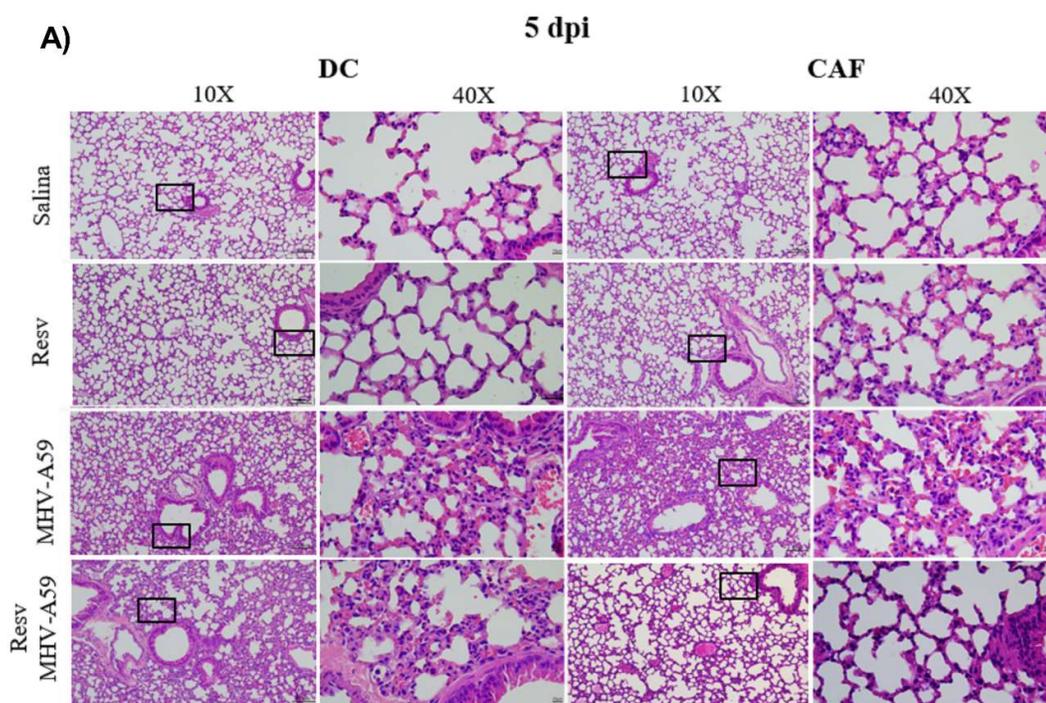


Figura 29. O tratamento com resveratrol reduz a lesão pulmonar e a inflamação induzidas pela infecção com MHV-A59 em animais com obesidades. (A) Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de seções pulmonares (n = 4-8) no quinto dia pós-infecção (5 dpi.) dos animais do grupo dieta de cafeteria (CAF) e dieta convencional (DC) infectados ou não com MHV-A59 (3×10^5 PFU) e tratados ou não com resveratrol (50mg/kg/dia). Barras de escala de 10 e 100 μ m. **(B)** Pontuação do escore histopatológico pulmonar do 5 dpi dos animais CAF e grupo controle infectados ou não com MHV-A59 e tratados ou não com resveratrol. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD. * Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Ao analisar os parâmetros relacionados a danos pulmonares e inflamação, observamos que 5 dpi houve a redução da quantidade de proteínas totais e dano celular por reduzir os níveis LDH no BAL, e diminuição da concentração de nitrito no pulmão dos animais CAF durante a infecção e tratamento com resveratrol comparado aos animais CAF infectados e não tratados. Enquanto nos animais do grupo DC, o tratamento com resveratrol na presença do vírus promoveu a redução do dano celular pela diminuição dos níveis de LDH do BAL em comparação aos animais DC infectados e não tratados (Figura 30 A, B, C).

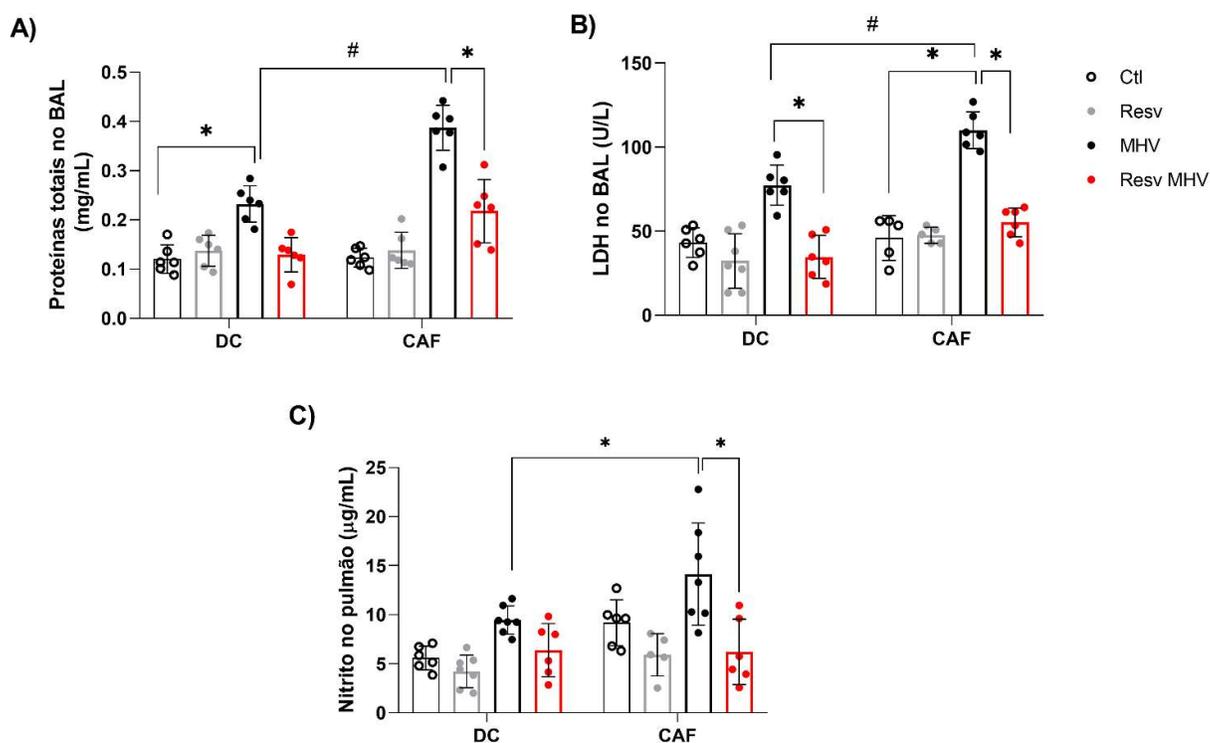


Figura 30. Resveratrol reduz danos pulmonares nos animais com obesidade na infecção por MHV-A59. (A) Avaliação dos níveis de proteínas totais no BAL **(B)** LDH no BAL e **(C)** quantidade de nitrito no tecido pulmonar dos animais CAF e grupo controle após infecção com MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol

no 5 dpi. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD. *, # Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Tendo em vista que a produção disfuncional de citocinas e quimiocinas é uma característica relacionada com a gravidade da doença durante a infecção por coronavírus, avaliamos os níveis dos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios em modelo de obesidade durante a infecção por coronavírus MHV-A59 e tratamento com resveratrol. Os animais CAF infectados com MHV-A59, apresentaram níveis maiores das quimiocinas pró-inflamatórias CCL2 e CXCL1 comparado aos encontrados nos animais DC infectados. Curiosamente, observamos que o resveratrol reduziu de modo significativo os níveis de ambas as quimiocinas nos animais CAF, enquanto reduziu somente os níveis de CCL2 nos animais DC, na presença da infecção pelo vírus (Figura 31 A, B). Ao analisar os níveis das citocinas pró-inflamatórias no 2 dpi, os resultados demonstraram que tanto os animais CAF quanto os animais DC apresentaram níveis semelhantes de IL-6 e TNF. Apesar do tratamento com resveratrol, não foi observada redução dos níveis dessas citocinas nos grupos de animais CAF e DC na presença da infecção por MHV-A59 (Figura 31 C, D). Além disso, o tratamento com resveratrol não aumentou os níveis das citocinas IL-10 e IFN- β nos animais dos grupos CAF e DC na infecção com o vírus (Figura 31 E, F).

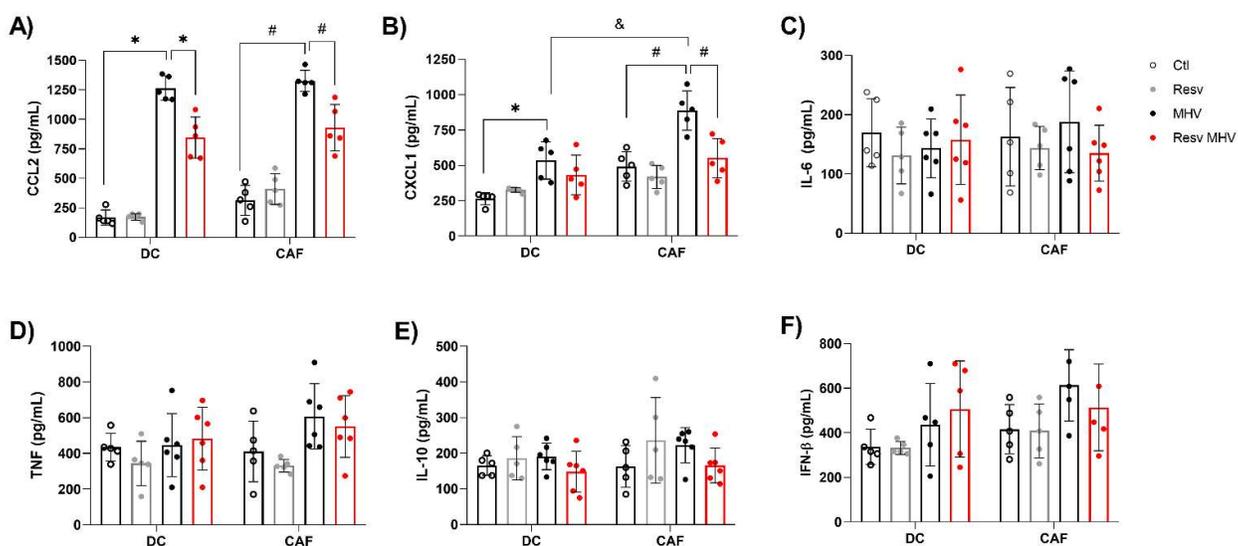


Figura 31. Resveratrol reduz a inflamação pulmonar em animais com obesidade na infecção por MHV-A59 no 2 dpi. (A) Níveis de quimiocinas CCL2 e **(B)** CXCL1, **(C)** e níveis de citocinas TNF, **(D)** IL-6, **(E)** IL-10 e **(F)** IFN- β no pulmão dos animais CAF e animais do grupo controle no 2 dpi após infecção com MHV-

A59 e tratamento ou não com resveratrol (n=5-6). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD. *,&, # Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Nossos resultados mostraram que no 5 dpi o tratamento com o resveratrol continuou reduzindo os níveis das quimiocinas pró-inflamatórias CCL2 e CXCL1 nos animais CAF infectados comparado aos animais CAF infectados e não tratados com a droga. Além disso, os níveis de ambas as quimiocinas se mostraram mais elevados nos animais CAF infectados quando comparados aos animais do grupo DC infectados (Figura 32 A, B). Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF no 5 dpi foram semelhantes entre os animais do grupo CAF e grupo DC na infecção por MHV-A59. Além disso, o tratamento resveratrol não alterou os níveis dessas citocinas na presença da infecção pelo vírus em animais dos grupos CAF e DC (Figura 32 C, D). Embora o tratamento com resveratrol não tenha promovido um aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, ele foi capaz de restaurar os níveis da citocina IFN- β , relacionada à resposta antiviral, ao nível basal nos animais CAF infectados com o vírus MHV-A59 no 5 dpi (Figura 32 E, F).

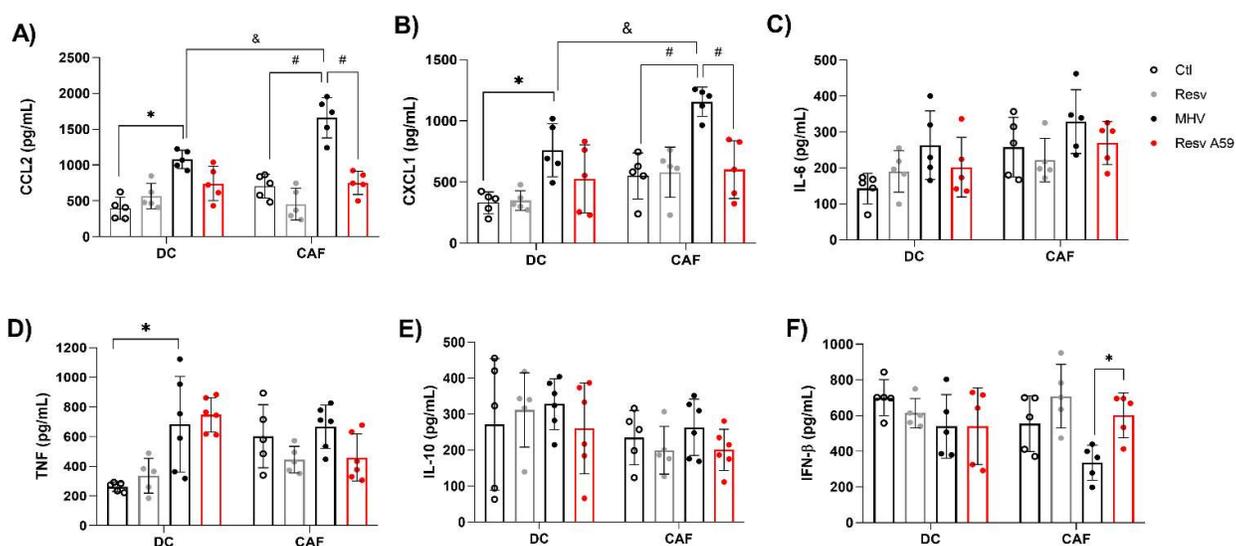


Figura 32. Resveratrol reduz a inflamação pulmonar em animais com obesidade na infecção por MHV-A59 no 5 dpi. (A) Níveis de quimiocinas CCL2 e (B) CXCL1, (C) e níveis de citocinas TNF, (D) IL-6, (E) IL-10 e (F) IFN- β no pulmão dos animais CAF e animais do grupo controle no 5 dpi após infecção com MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol (n=5-6). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm SD. *,&, # Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.3.3 Resveratrol reduziu a migração de neutrófilos em animais com obesidade durante a infecção com MHV-A59

Para compreender melhor a proteção do tratamento com resveratrol em animais com obesidade durante a infecção com MHV-A59, avaliamos a população de células no BAL e sangue dos animais dos grupos CAF e DC. Nossos resultados mostraram que no 5 dpi os animais do grupo DC infectados com MHV-A59 apresentaram uma maior contagem de células totais e aumento de macrófagos no BAL em relação aos animais CAF infectados (Figura 33 A, B). Ao analisarmos a atividade de NAG no pulmão dos animais infectados, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CAF e DC, independentemente do tratamento com a droga durante a infecção pelo MHV-A59 (Figura 33 C). Além disso, o tratamento com resveratrol não levou ao aumento do número de linfócitos nos animais do grupo CAF e no do grupo DC durante a infecção (Figura 33 D). No entanto, a contagem de neutrófilos no BAL dos animais CAF infectados foi maior em comparação aos animais do grupo DC infectados não tratados, e na presença do tratamento com o resveratrol animais CAF infectados apresentaram uma redução significativa de neutrófilos no BAL (Figura 33 E). Esses achados foram corroborados pelo ensaio de atividade de MPO e imuno-histoquímica do pulmão, que revelaram uma maior atividade da enzima MPO e porcentagem de células positivas para Ly6G no pulmão dos animais CAF infectados em comparação com os animais DC infectados, correspondendo a um aumento de neutrófilos nesse tecido (Figura 33 F, G, H). Observamos que o tratamento com resveratrol, tanto os animais CAF infectados quanto os animais do grupo controle infectados apresentaram uma redução significativa da porcentagem de células positivas para Ly6G no tecido pulmonar (Figura 33 G, H). Esses resultados sugerem que, no contexto de obesidade onde é observado uma inflamação crônica e na presença do vírus MHV-A59, os neutrófilos podem estar desempenhando um papel mais pronunciado na promoção da inflamação e na gravidade da doença nesses animais, que é atenuado pelo tratamento com resveratrol.

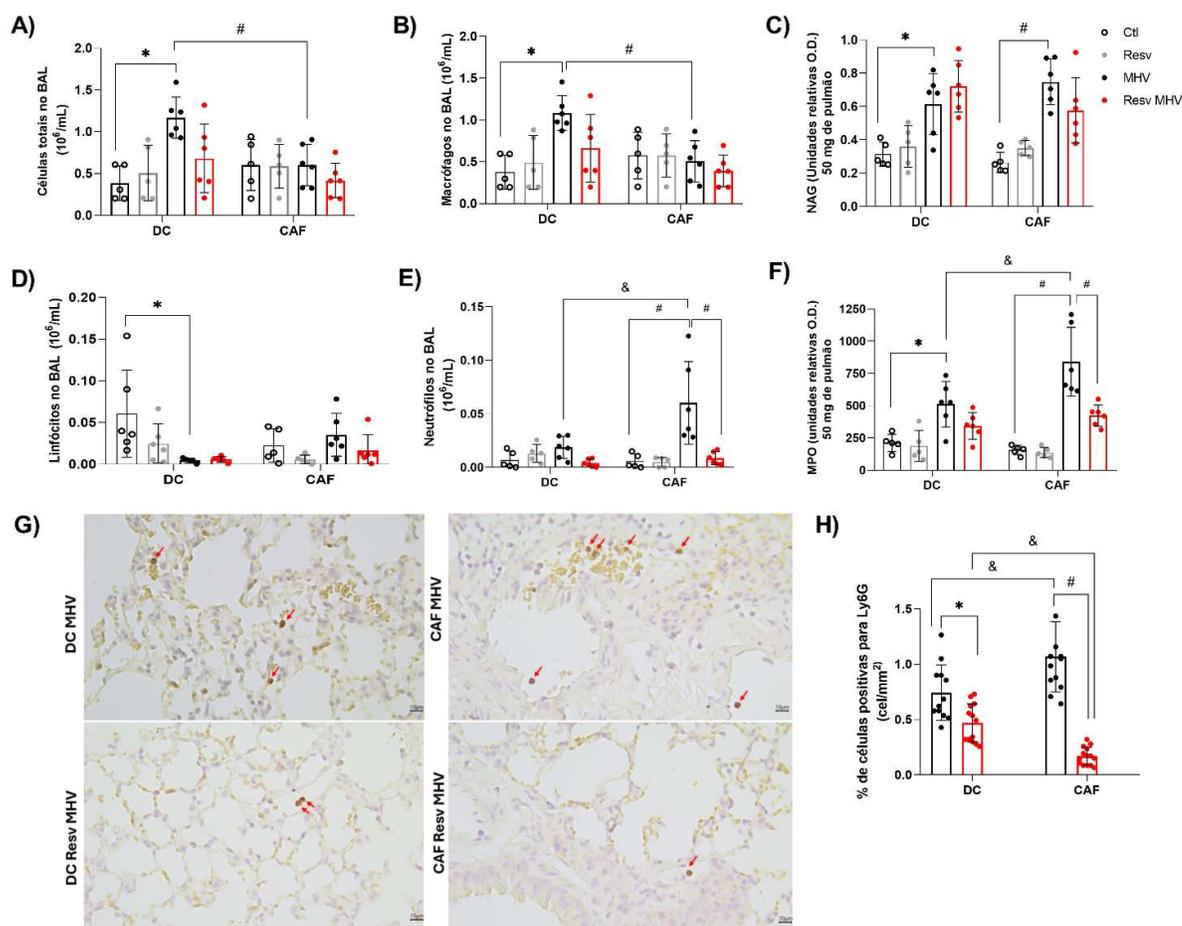


Figura 33. Resveratrol reduz os neutrófilos do pulmão dos animais CAF na infecção por MHV-A59. (A) Contagem total de células do BAL; (B-C) População de macrófagos no BAL e atividade da NAG; (D) Contagem de linfócitos no BAL; (E-F) Contagem de neutrófilos no BAL e atividade da MPO em camundongos infectados ou não pelo MHV-A59 e tratados ou não com resveratrol (n=6). (G) Imagens representativas da imunohistoquímica de seções do pulmão dos grupos experimentais e (H) quantificação de células positivas para Ly6G (em marrom) em quarenta campos aleatórios por amostra, expressa como número de células positivas por mm² para detecção de neutrófilos no pulmão dos diferentes grupos experimentais (n = 12-14). Escala de 10 μ M. Dados apresentados como média \pm SEM. Diferenças entre grupos foram avaliadas por two-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. *, #, & Representam a diferença significativa (p < 0,05) entre os grupos analisados.

A análise contagem de células do sangue no 5 dpi, nos animais CAF e nos animais DC infectados com MHV-A59 e tratados com resveratrol não revelou diferenças significativas na população total de leucócitos (Figura 34 A). Além disso, no 5 dpi o tratamento com o resveratrol não conseguiu reverter o quadro de linfopenia tanto nos animais CAF quanto nos animais do grupo DC durante a infecção (Figura 34 B). Entretanto, no 5 dpi,

o tratamento com resveratrol reduziu de maneira significativa os níveis de neutrófilos no sangue e a razão de neutrófilos por linfócitos nos animais CAF durante a infecção comparado aos animais CAF infectados não tratados. Além disso, foi observado que os animais CAF infectados com MHV-A59 não tratados com resveratrol, apresentaram um aumento de neutrófilos circulantes e uma razão de neutrófilos por linfócitos maior que os animais do grupo DC infectados não tratados, indicando uma resposta inflamatória desregulada nos animais com obesidade durante a infecção pelo vírus (Figura 34, C, D).

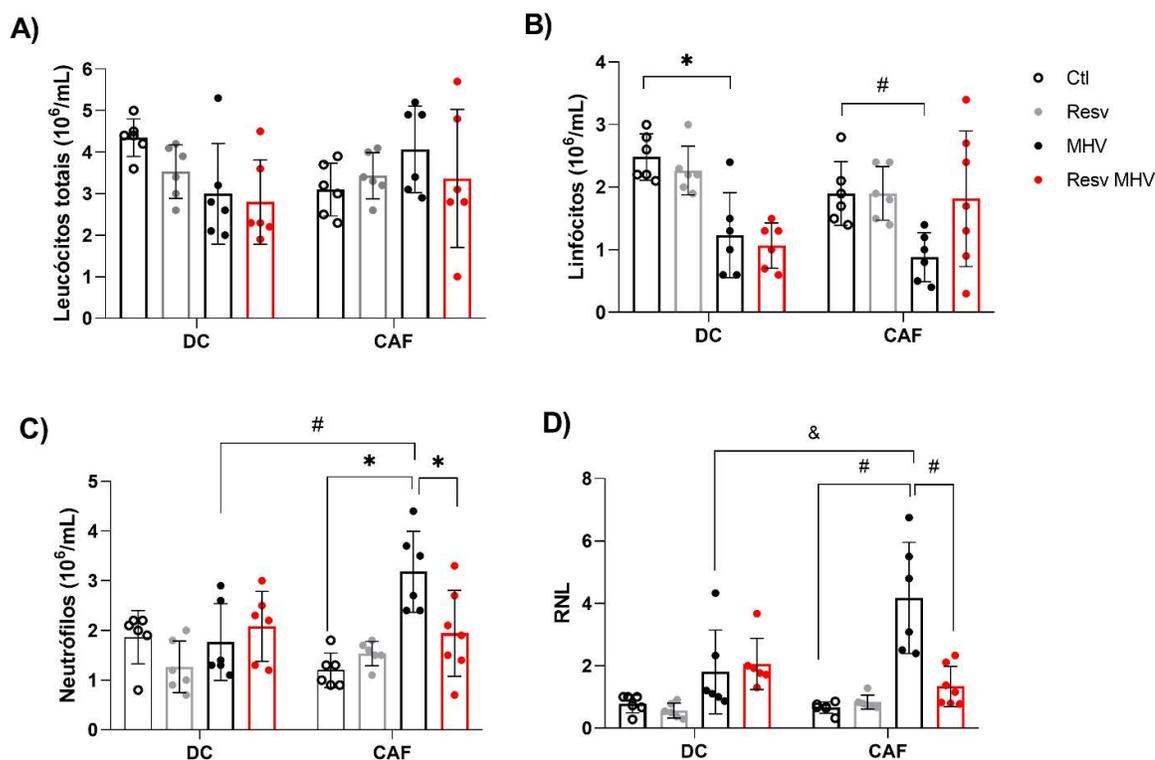


Figura 34. Resveratrol reduz os neutrófilos do sangue dos animais CAF na infecção por MHV-A59. (A) Contagem de leucócitos do sangue; (B) linfócitos; (C) neutrófilos e (D) razão de neutrófilos por linfócitos do sangue (n=6). Dados apresentados como média \pm SEM. Diferenças entre grupos foram avaliadas por two-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. *, #, & Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.3.4 Resveratrol reduziu a ativação dos neutrófilos de animais com obesidade durante infecção com MHV-A59

Para investigar os possíveis mecanismos pelos quais o resveratrol poderia atuar na função dos neutrófilos dos animais com obesidade durante a infecção pelo vírus MHV-A59, utilizamos como modelo experimental neutrófilos derivados da medula óssea (BMDN) dos animais CAF e animais DC, para avaliação da liberação de ROS durante a infecção com o vírus na ausência ou presença do tratamento com resveratrol. Nossos resultados demonstraram que, na ausência do tratamento com resveratrol, houve um maior aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos neutrófilos dos animais CAF em comparação a produção de ROS pelos neutrófilos dos animais do grupo DC durante a infecção pelo MHV-A59. Em contrapartida, o tratamento com resveratrol levou à redução significativa na produção de ROS tanto pelos neutrófilos dos animais CAF e quanto dos animais do grupo controle, mesmo na presença do vírus, destacando o papel antioxidante do resveratrol na mitigação do estresse oxidativo causado pelos neutrófilos em resposta à infecção pelo MHV-A59 (Figura 35 A).

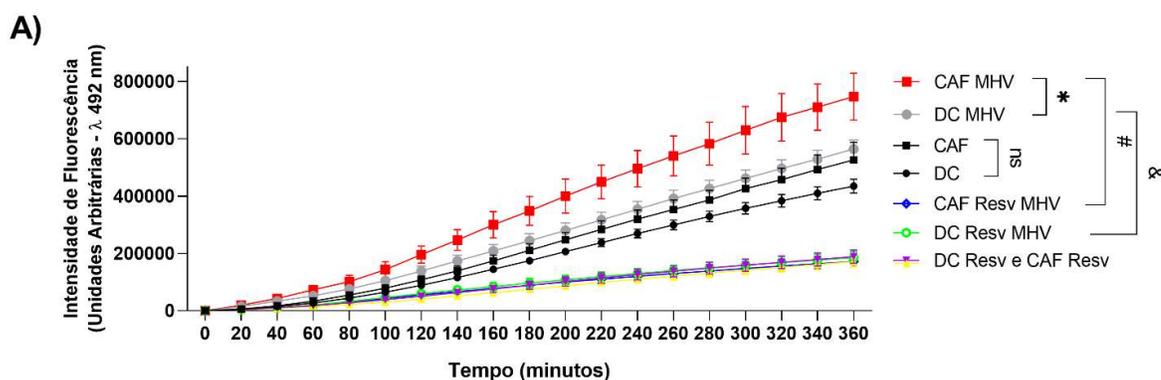


Figura 35. Resveratrol atenua a liberação de ROS e NETs pelos neutrófilos de animais CAF durante a infecção pelo MHV-A59. (A) Cinética da liberação de ROS no tempo de 6 horas por neutrófilos derivados da medula óssea de animais CAF e animais dieta convencional durante a infecção com MHV-A59 na MOI de 1 e tratamento com 80 μ M de resveratrol (n= 5). Dados apresentados como média \pm SEM. Diferenças entre grupos foram avaliadas por two-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. *, #, & Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.3.5 Resveratrol melhora os parâmetros relacionados à obesidade e reduz os títulos do MHV-A59 no tecido adiposo dos animais com obesidade

Para investigar se o tratamento com resveratrol poderia exercer efeitos anti-inflamatórios no tecido adiposo visceral de animais CAF, um tecido-chave no

estabelecimento e manutenção da inflamação crônica associada à obesidade, avaliamos os níveis plasmáticos das adipocinas (adiponectina e leptina). Nossos resultados demonstraram que durante a infecção com o vírus MHV-A59 no 2 dpi, os níveis plasmáticos da adiponectina se encontravam reduzidos nos animais CAF em comparação aos animais DC. De maneira interessante, os animais CAF tratados com resveratrol durante a infecção apresentaram níveis plasmáticos elevados de adiponectina, uma adipocina reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, em comparação aos grupos infectados CAF e DC que não receberam tratamento. Além disso, os níveis de adiponectina nos animais CAF infectados e tratados com resveratrol foram significativamente maiores aos observados no grupo DC submetido ao mesmo protocolo de infecção e tratamento (Figura 36 A). Ao avaliar os níveis plasmáticos de adiponectina no 5 dpi nos animais CAF e animais DC infectados, foi observado que o tratamento com resveratrol promoveu maior aumento dessa adipocina, sugerindo um efeito terapêutico do resveratrol no equilíbrio metabólico durante a infecção por MHV-A59 (Figura 36 B). Além disso, observamos que os níveis plasmáticos da leptina no 2 e 5 dpi, observamos que os animais CAF, na ausência da infecção com o vírus MHV-A59 apresentaram níveis significativamente aumentados dessa adipocina pró-inflamatória. Esses níveis aumentam ainda mais na presença da infecção por MHV-A59 nos animais CAF não tratados. No entanto, o tratamento com resveratrol foi capaz de reduzir esses níveis de maneira significativa (Figura 36 C, D).

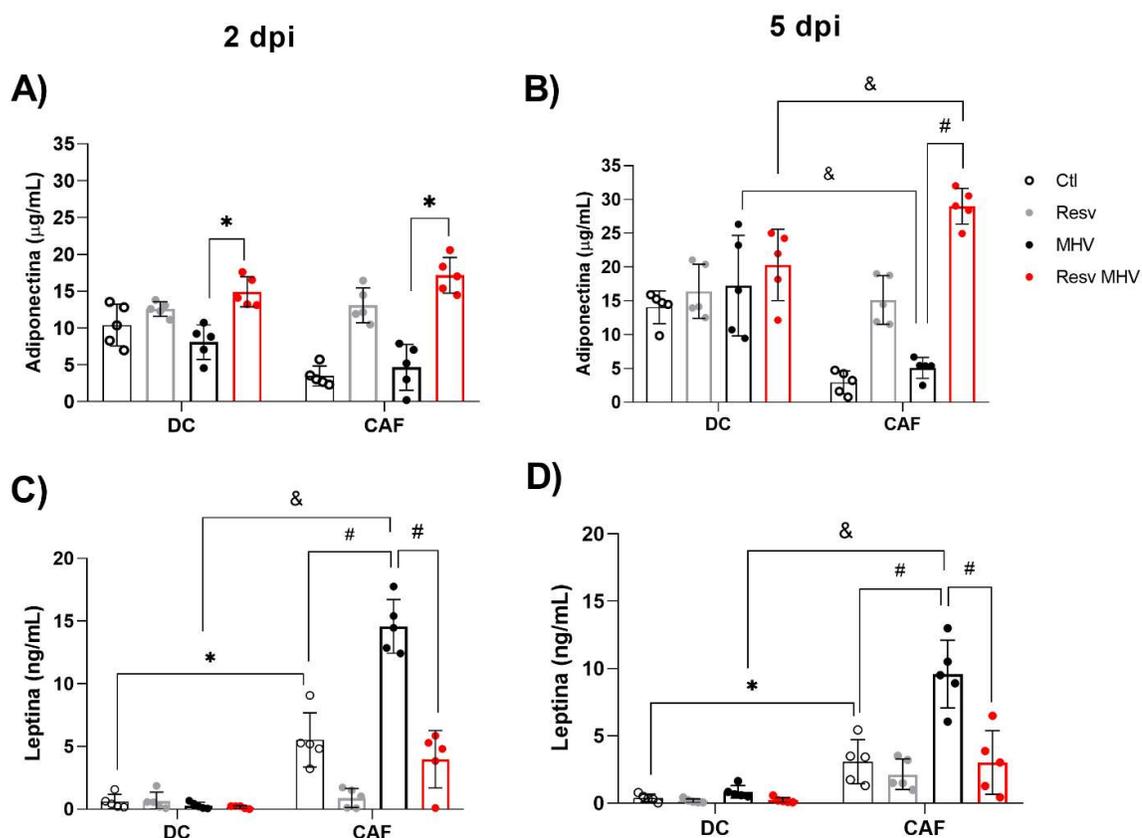


Figura 36. Resveratrol melhora os parâmetros inflamatórios relacionados a obesidade no contexto de infecção. (A) Níveis plasmáticos da adiponectina no 2dpi (B) e adiponectina no 5dpi; (C) níveis plasmáticos da leptina no 2 dpi (D) e leptina no 5 dpi em animais dos grupos CAF e DC na ausência ou presença de infecção pelo MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol (n=6). Dados apresentados como média \pm SEM. Diferenças entre grupos foram avaliadas por two-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. *, #, & Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Em seguida, avaliamos parâmetros metabólicos relacionados à obesidade, bem como a expressão de TNF e títulos virais no tecido adiposo epididimal dos animais dos grupos CAF e DC. No 5 dpi, os animais CAF apresentavam níveis elevados de colesterol, triglicérides e glicose comparado aos animais DC na infecção. Entretanto, o resveratrol foi capaz de melhorar esses parâmetros metabólicos visto pela redução significativa dos níveis de colesterol, triglicérides e glicose no plasma dos animais CAF durante a infecção com MHV-A59 (Figura 37 A, B, C). Além disso, observamos uma redução significativa na expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória TNF no tecido adiposo epididimal dos animais CAF durante a infecção pelo vírus e o tratamento com resveratrol, demonstrando seu potencial anti-inflamatório no contexto da obesidade e infecção por betacoronavírus

(Figura 37 D). Curiosamente, ao analisar os títulos virais no tecido adiposo epididimal dos animais CAF no 5 dpi, observamos uma redução significativa na carga viral nos tecidos dos animais CAF tratados com resveratrol (Figura 37 E). Esses achados sugerem um efeito antiviral do resveratrol ao modular a inflamação nos animais com obesidade no contexto de infecção por coronavírus murino.

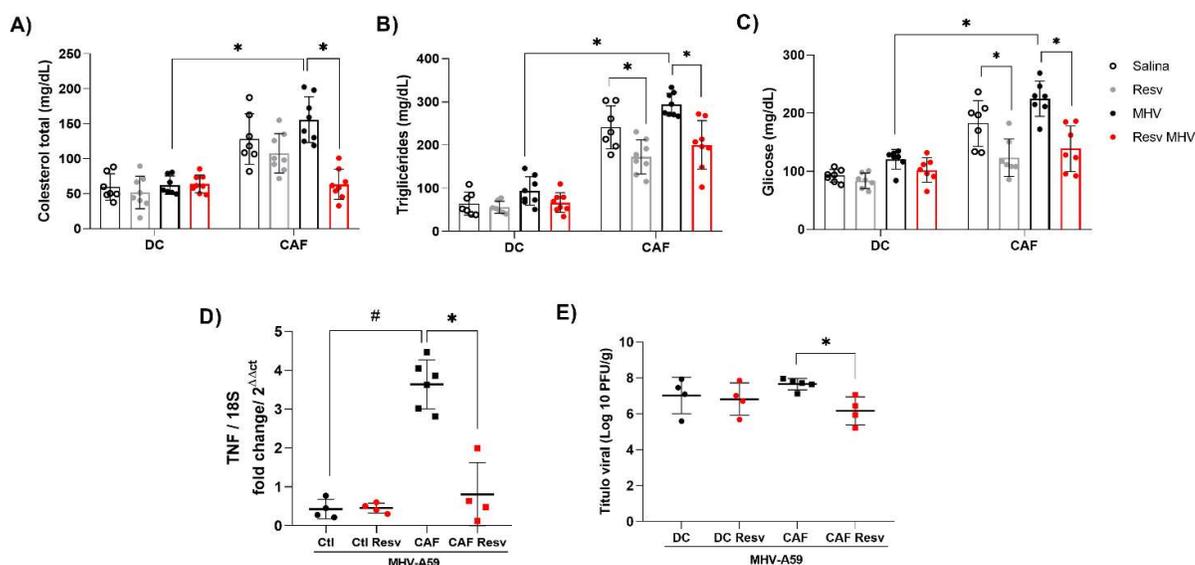


Figura 37. Resveratrol melhora os parâmetros metabólicos relacionados a obesidade e reduz a carga viral no tecido adiposo dos animais CAF. (A) Níveis plasmáticos do colesterol, (B) triglicérides, (C) glicose no 2 e 5 dpi nos animais CAF e dieta controle (DC) infectados com MHV-A59 e tratados ou não tratados com resveratrol. (D) Níveis de expressão do mRNA de TNF no tecido adiposo epididimal no 5 dpi. (E) Títulos virais do MHV-A59 no tecido adiposo epididimal. Dados apresentados como média \pm SEM. Diferenças entre grupos foram avaliadas por two-way ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey. *, #, & Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.4 Efeitos terapêuticos do resveratrol na infecção por SARS-CoV-2 em modelo K18-hACE2 de obesidade induzida por dieta

Inicialmente realizamos a padronização do modelo de obesidade em fêmeas K18-hACE2 submetidas a dieta de cafeteria (CAF) ou dieta convencional (DC) durante quatro semanas. Observamos um ganho de peso significativo nos animais K18-hACE2 CAF em comparação aos animais K18-hACE2 DC (Figura 38 A). Além disso, observamos o aumento

significativo nos parâmetros metabólicos associados à obesidade no grupo K18-hACE2 CAF, incluindo os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides em comparação ao grupo K18-hACE2 DC (Figura 38 B, C, D).

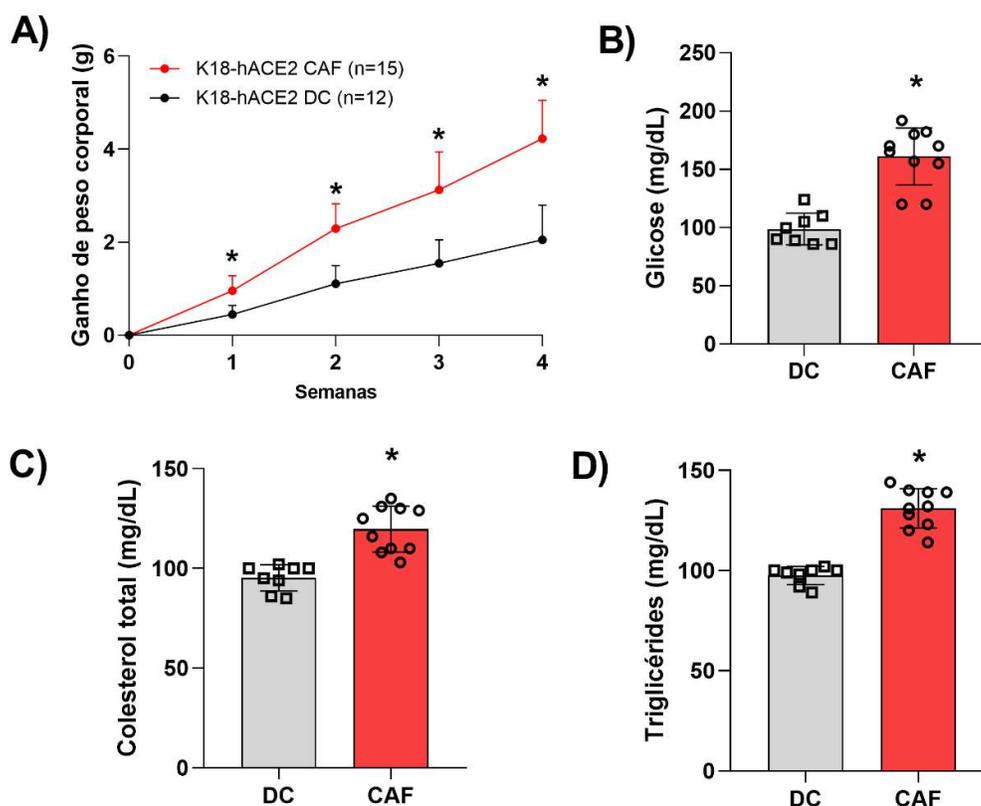


Figura 38. Padronização do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria em animais K18-hACE2. (A) Ganho de peso durante o período da dieta. (B) Níveis plasmáticos de glicose, (C) colesterol total e (D) triglicérides em animais K18-hACE2 CAF e DC após quatro semanas de dieta. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Sidak's (A). Para os gráficos B,C e D foi realizado o teste T. Os dados são apresentados como média \pm SD, n=8-15. *Representa uma diferença significativa ($p < 0,05$).

Para investigar se o tratamento com resveratrol poderia reproduzir os efeitos terapêuticos observados no modelo experimental de obesidade e infecção por MHV-A59 — incluindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais e melhora dos parâmetros metabólicos — nós buscamos validar os efeitos do tratamento com o composto natural em um modelo murino expressando o receptor humano ECA2 (K18-hACE2) e que permite a infecção com o vírus SARS-CoV-2.

Ao avaliar o dano pulmonar no terceiro dia pós-infecção (3 dpi), apesar do ganho de peso em fêmeas K18-hACE2 CAF a susceptibilidade às lesões pulmonares induzidas por SARS-CoV-2 não foi agravada pela obesidade e se encontravam semelhante ao grupo dieta convencional. Além disso, mesmo com o tratamento com resveratrol não observamos redução das lesões pulmonares na infecção com SARS-CoV-2 em fêmeas K18-hACE2 do grupo CAF e DC (Figura 39 A, B). No entanto, nos animais CAF e DC infectados com SARS-CoV-2 e tratados com resveratrol, foi observada uma redução significativa na carga viral no tecido pulmonar em comparação aos grupos CAF e DC infectados e não tratados (Figura 39 C). Posteriormente, para avaliarmos de forma indireta a presença de macrófagos e neutrófilos no pulmão desses animais, analisamos a atividade das enzimas NAG e MPO no tecido pulmonar no 3 dpi. Observamos que os animais do grupo DC durante a infecção com SARS-CoV-2 apresentaram uma atividade significativamente maior da enzima NAG em comparação tanto ao grupo de animais tratados com o veículo (Salina) quanto aos animais CAF infectados. Entretanto, os animais CAF infectados com SARS-CoV-2 e tratados com resveratrol demonstraram uma atividade de NAG significativamente reduzida em relação aos animais CAF infectados e não tratados (Figura 39 D). Em contrapartida, ao se avaliar a atividade de MPO, foi observado que animais CAF apresentaram uma maior atividade da enzima em comparação ao grupo DC, que foi reduzida com o tratamento com resveratrol (Figura 39 E).

Posteriormente, investigamos no 3 dpi os efeitos do tratamento com o resveratrol sobre os níveis de citocinas e quimiocinas no pulmão dos animais K18-hACE2 CAF e animais dieta controle. O tratamento com resveratrol não reduziu os níveis da citocina IL-6 e quimiocinas CXCL1 e CCL5 nos animais DC infectados com SARS-CoV-2. Além disso, na ausência do tratamento com o resveratrol, os animais CAF apresentaram níveis significativamente maiores da citocina IL-6 durante a infecção em comparação aos animais CAF tratados com o veículo e animais DC infectados e não tratados. No entanto, tratamento com o resveratrol promoveu a redução significativa dos níveis das quimiocinas CXCL1 nos animais DC e reduziu os níveis de CXCL1 e CCL2 nos animais CAF durante a infecção com SARS-CoV-2. Além disso, durante a infecção, os níveis de CXCL1 estavam significativamente mais elevados nos animais CAF em comparação aos níveis observados no grupo DC. Curiosamente, na ausência da infecção, observamos que os níveis de TNF, CCL2 e CCL5 significativamente aumentados nos animais CAF tratados com o veículo em comparação aos animais do grupo DC também tratados com o veículo. Além disso, nos

animais CAF infectados com SARS-CoV-2, mesmo com o tratamento com resveratrol, os níveis da citocina TNF e da quimiocina CCL5 não apresentaram redução significativa. Ao analisar os níveis de IFN- γ , observamos que, na ausência de infecção por SARS-CoV-2, os animais do grupo controle (DC) tratados com veículo apresentaram níveis significativamente mais elevados dessa citocina em comparação aos animais CAF tratados com veículo. Além disso, durante a infecção, mesmo com o tratamento com resveratrol, os níveis de IFN- γ e IFN- β nos animais CAF e DC não apresentaram aumento significativo (Figura 39 F). Esses resultados sugerem que, na ausência de infecção por SARS-CoV-2, os animais CAF apresentam uma inflamação de baixo grau associada à obesidade, evidenciada pelos níveis aumentados dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, CCL2 e CCL5. Além disso, esses animais também exibem níveis elevados da quimiocina CXCL1 durante a infecção, o que pode estar relacionado à maior migração de neutrófilos para o pulmão. Apesar do tratamento com resveratrol, tanto os animais CAF quanto os animais DC apresentaram uma resposta atrasada aos diferentes interferons (IFN- γ e IFN- β) em decorrência da infecção por SARS-CoV-2.

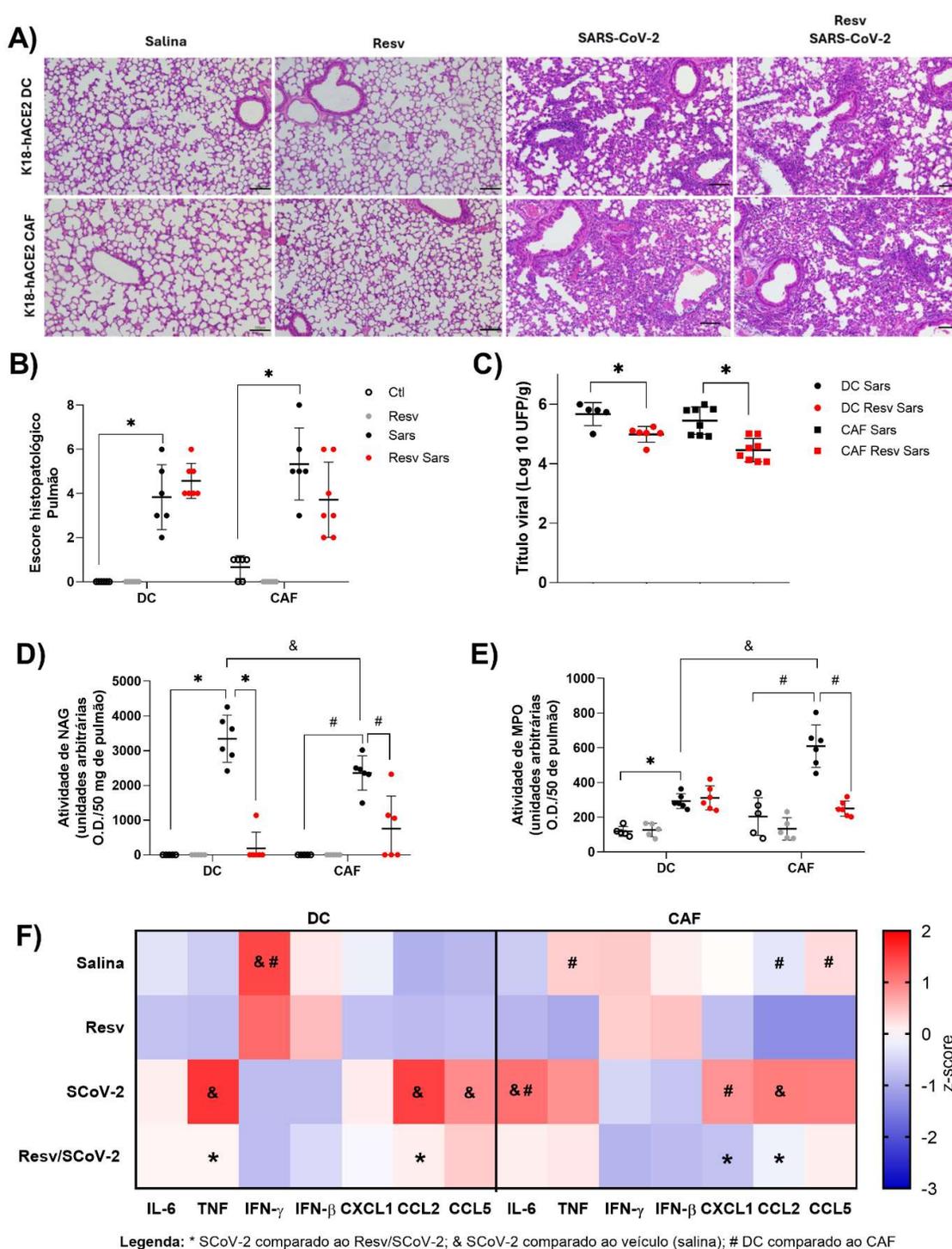


Figura 39. Resveratrol reduz a população de células, carga viral e a inflamação no pulmão dos animais CAF durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2. (A) Coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de seções pulmonares (n = 6-8) e (B) pontuação do escore histopatológico do pulmão no terceiro dia pós-infecção (3 dpi.) dos animais K18-hACE2 do grupo dieta de cafeteria (CAF) e dieta convencional (DC) infectados ou não com SARS-CoV-2 (7×10^4 PFU) e tratados ou não com resveratrol (50mg/kg/dia). Barras de escala de 10 μ m. (C) qPCR do pulmão para avaliação dos títulos virais no pulmão dos animais CAF e DC no 3 dpi após infecção

com MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol. **(D)** Atividade da enzima NAG e **(E)** MPO no pulmão dos animais CAF e DC DC no 3 dpi após infecção com MHV-A59 e tratamento ou não com resveratrol. **(F)** Avaliação dos níveis das citocinas IL-6, TNF, IFN- γ , IFN- β e quimiocinas CXCL1, CCL2 e CCL5 no pulmão dos animais CAF e DC na ausência ou presença da infecção por SARS-CoV-2 e tratamento ou não com resveratrol. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para avaliar as diferenças entre os níveis de citocinas e quimiocinas dos grupos de animais CAF e DC foi utilizado o Z-escore. Os dados são apresentados como média \pm SEM. *, &, # Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

5.4.1 Resveratrol melhorou os parâmetros metabólicos associados a obesidade em animais K18-hACE2 na infecção por SARS-CoV-2

No 3º dia pós-infecção (3 dpi), investigamos se o tratamento com resveratrol apresentaria efeitos terapêuticos no tecido adiposo gonadal de animais CAF e DC durante a infecção por SARS-CoV-2. Inicialmente, analisamos os títulos virais de SARS-CoV-2 no tecido gonadal e detectamos a presença do vírus nos animais CAF e DC. Apesar do tratamento com resveratrol, os títulos virais no 3º dpi permaneceram semelhantes aos observados nos animais CAF e DC infectados e não tratados (Figura 40 A). No entanto, no 3 dpi, o tratamento com resveratrol reduziu significativamente os níveis de expressão de TNF no tecido adiposo gonadal dos animais CAF, tanto em comparação com os animais CAF tratados com resveratrol durante a infecção com SARS-CoV-2 quanto com os animais DC infectados e não tratados (Figura 40 B).

Posteriormente, avaliamos os parâmetros metabólicos desses animais e observamos que o tratamento com resveratrol promoveu a redução significativa dos níveis de glicose e colesterol, com exceção dos níveis de triglicérides, em animais CAF durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2. Além disso, tanto os animais CAF tratados com o veículo quanto os animais CAF infectados com o vírus apresentavam níveis elevados de glicose, colesterol e triglicérides em comparação aos animais DC tratados com o veículo e animais DC infectados com o vírus (Figura 40 C, D, E).

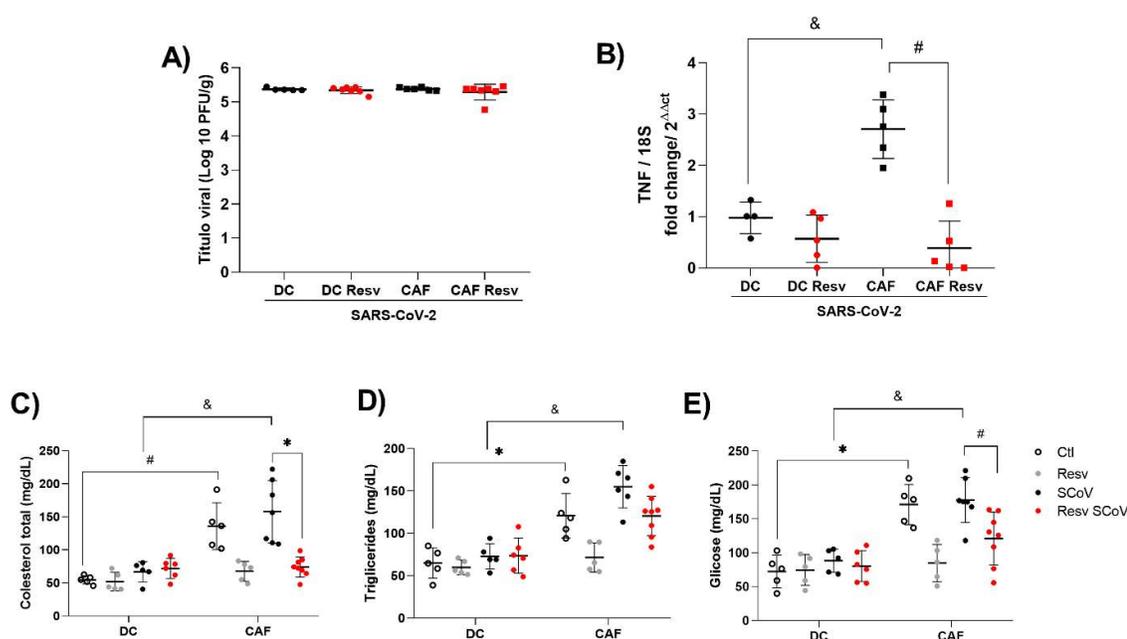


Figura 40. Resveratrol melhora os parâmetros metabólicos associados a obesidade durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2. (A) Títulos virais de SARS-CoV-2 no tecido adiposo gonadal no terceiro dia após infecção (3 dpi) em animais CAF e DC tratados ou não tratados com resveratrol (50 mg/kg/dia). (B) Níveis de expressão do mRNA mensageiro da citocina TNF no tecido adiposo gonadal durante a infecção por SARS-CoV-2 em animais dos grupos CAF e DC tratados ou não tratados com resveratrol. (C) Níveis plasmáticos de glicose, (D) triglicérides e (E) colesterol em animais dos grupos CAF e DC durante infecção com SARS-CoV-2 e tratados ou não tratados com resveratrol. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela two-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados são apresentados como média ± SEM. *,#, & Representam a diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

DISCUSSÃO DO CAPÍTULO 3

Resveratrol é um composto natural bem conhecido por seus efeitos pleiotrópicos, incluindo propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, anti-trombogênicas, anticancerígenas, neuroprotetoras e cardioprotetoras (Khattar *et al.*, 2022). Além disso, desempenha um papel benéfico na obesidade e nas condições metabólicas associadas, como a resistência à insulina. O resveratrol tem sido amplamente investigado por seus efeitos terapêuticos e como nutracêutico, com destaque para seu potencial no tratamento de diferentes doenças, incluindo distúrbios relacionados à regulação metabólica e à inflamação (Khattar *et al.*, 2022), e vem sendo sugerido como uma estratégia terapêutica para a COVID-19 (Brummelen e Brummelen, 2022; Russo *et al.*, 2023).

Considerando as evidências a respeito do potencial farmacológico do resveratrol, buscamos investigar os efeitos do tratamento com resveratrol em modelos experimentais durante a infecção por coronavírus. Realizamos inicialmente a padronização da infecção pelos vírus MHV-3 (modelo experimental que mimetiza a COVID-19 grave) e MHV-A59 (modelo experimental que mimetiza uma COVID-19 leve a moderada) em linhagem celular RAW 264.7.

Em nossos resultados observamos que o tratamento prévio ou pós-infecção com resveratrol demonstrou efeitos profiláticos e terapêuticos, respectivamente, protegendo os macrófagos da infecção pelos vírus MHV-3 e MHV-A59. O tratamento pós-infecção na concentração de 80 μ M com o resveratrol resultou em uma maior diminuição das partículas virais infectivas dos vírus MHV-3 e MHV-A59 nos macrófagos. Esse potencial antiviral do tratamento com resveratrol têm sido relatado em estudos para diferentes vírus respiratórios como vírus influenza (H1N1 e H3N2) (Palamara *et al.*, 2005; Fioravanti *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015), vírus sincicial respiratório (VSR) (Xie *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Zang *et al.*, 2015) rhinovirus humano (HRV) (Mastromarino *et al.*, 2015), metapneumovírus humano (hMPV) (Komaravelli *et al.*, 2015), incluindo coronavírus humanos como MERS-CoV (Lin *et al.*, 2017) e SARS-CoV (Li *et al.*, 2006; DeDiego *et al.*, 2014).

Na infecção pelo betacoronavírus MERS-CoV, o tratamento de 24 e 48 horas com resveratrol em células Vero E6 pós-infecção reduziu os níveis de RNA genômico do vírus em mais de 90% com o tratamento a partir de 80 μ M. Além disso, o tratamento com 150 μ M também reduziu a expressão das proteínas do nucleocapsídeo, enquanto com 250 μ M as expressões das proteínas foram completamente inibidas, conforme marcação com o anticorpo anti-N das proteínas do nucleocapsídeo (Lin *et al.*, 2017).

Em infecções *in vitro* com o vírus influenza diferentes mecanismos do resveratrol foram relatados, incluindo redução da tradução de proteínas virais tardias e bloqueio da translocação núcleo-citoplasmática de ribonucleoproteínas do vírus, etapa chave da replicação viral que precede a montagem e liberação dos vírions (Palamara *et al.*, 2005). Além disso, o tratamento com o resveratrol reduziu a infectividade do vírus influenza *in vitro*, ao diminuir a maturação da hemaglutinina (Fioravanti *et al.*, 2012) e a expressão das neuraminidases (Lin *et al.*, 2015).

Após avaliação do efeito antiviral do resveratrol, investigamos o papel anti-inflamatório desse composto natural. Observamos que o pré-tratamento e o tratamento pós-

infecção com resveratrol reduziu os níveis de IL-6, TNF e CXCL2 em macrófagos tanto na infecção pelo vírus MHV-3 quanto por MHV-A59. Em conjunto, esses achados demonstram tanto um efeito antiviral quanto anti-inflamatórios do resveratrol na infecção por betacoronavírus murinos.

Há evidências crescentes de que o resveratrol pode exercer efeitos antivirais ao modular vias de sinalização da célula hospedeira envolvidas na replicação viral, incluindo vias de sinalização relacionadas a resposta inflamatória (Filardo *et al.*, 2020). Estudos têm relatado que o resveratrol pode atuar na redução de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas relacionados à resposta inflamatória disfuncional observada na COVID-19, como IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-1 α , TNF, IL-17, CXCL2, CXCL10 e CCL4 e RANTES (Komaravelli *et al.*, 2015; Mayangsari, Suzuk, 2018; Filardo *et al.*, 2020; Schlotterose *et al.*, 2023). A redução dos dessas citocinas e quimiocinas se deve a capacidade do resveratrol em modular diferentes vias de sinalização relacionadas a resposta inflamatória, como via ácido araquidônico (AA), proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), NF- κ B, STAT3 e NLRP3 (Li *et al.*, 2018; Filardo *et al.*, 2020; Meng, Xiao e He, 2021; Tufecki *et al.*, 2021).

Após validarmos os efeitos profiláticos e terapêuticos, evidenciados pelos efeitos antivirais e anti-inflamatórios do resveratrol em modelo *in vitro*, buscamos investigá-los em modelo experimental de obesidade induzida por dieta de cafeteria durante a infecção pelos betacoronavírus vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2. A ausência de evidências sobre os efeitos do resveratrol em modelos de obesidade durante infecções por coronavírus levantou a hipótese de que o tratamento com esse composto natural poderia apresentar efeitos terapêuticos, incluindo propriedades anti-inflamatória e/ou antiviral, o que ressalta a importância da investigação nesses cenários.

Para isso, estabelecemos os modelos experimentais de obesidade utilizando camundongos C57BL/6 WT e animais transgênicos K18-hACE2, que foram submetidos à dieta de cafeteria e água com açúcar ou à dieta convencional e água sem adição de açúcar. A dieta de cafeteria consiste no consumo de alimentos ultraprocessados desempenhando um papel central no ganho de peso devido à sua alta palatabilidade e densidade energética, mimetizando os padrões alimentares humanos baseados no consumo de “*fast food*” (Lalanza e Snoeren, 2021). Nesse sentido, o uso de diferentes intervenções dietéticas em modelos animais, incluindo as dietas do tipo “*high fat*”, “*high carbohydrate*” e cafeteria, se apresentam como ferramentas experimentais valiosas para investigar os mecanismos

envolvidos no desenvolvimento da obesidade e de doenças metabólicas relacionadas (Pinheiro-Castro *et al.*, 2019).

Reproduzimos o modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria, que, assim como relatado em outros estudos, demonstrou ser um modelo robusto e de maior relevância translacional para os hábitos alimentares humanos, especialmente no consumo de alimentos associados ao ganho de peso. Esse modelo reproduz diversos aspectos da obesidade e da síndrome metabólica associada, incluindo ganho de peso, aumento do índice de adiposidade, hiperglicemia, hiperlipidemia e inflamação sistêmica (Dos Reis Costa *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2023; Kagios *et al.*, 2025).

A obesidade representa um fator de risco significativo no contexto de infecções virais respiratórias, incluindo na COVID-19 (OMS, 2024). Está frequentemente associada a outras condições metabólicas, como resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão, bem como a um estado de inflamação crônica de baixo grau, os quais podem representar um agravante na vulnerabilidade do hospedeiro a infecções respiratórias, comprometendo a resposta imunológica e a resolução eficaz da infecção (Petrakis *et al.*, 2020; Martínez-Colón *et al.*, 2022). Portanto, investigamos, em modelo de obesidade, os impactos da infecção pelos vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2, bem como os efeitos do tratamento com o resveratrol nesses animais durante a infecção.

Nossos resultados demonstraram que os animais CAF durante a infecção com o MHV-A59 desenvolvem uma doença mais grave caracterizada por danos pulmonares mais significativos em relação aos animais submetidos a dieta convencional, que foram atenuados com o tratamento com resveratrol.

A obesidade é considerada um agravante em doenças respiratórias como pneumonia bacteriana e viral, além de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), e está entre os casos mais prevalentes que necessitaram de hospitalização ou ventilação mecânica (Abumweis; Alrefai; Alzoughool, 2022). A gravidade em doenças respiratórias associada à obesidade também tem sido observada em infecções por vírus respiratórios em modelos experimentais de obesidade. Um estudo demonstrou que a infecção pelos vírus influenza H1N1, HK68 e H3N2 em camundongos geneticamente obesos (B6.V-Lep^{ob}/J - [ob/ob]) e em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DIO) resultou em uma infecção mais grave e uma maior mortalidade desses animais em comparação aos animais submetidos a dieta convencional (O'Brien *et al.*, 2011). Além disso, em outro estudo, camundongos submetidos a dieta hiperlipídica e camundongos geneticamente obesos,

quando infectados com o vírus influenza H1N1 e submetidos a uma infecção secundária por *Streptococcus pneumoniae*, apresentaram um aumento significativo na mortalidade em comparação aos animais controles (Karlsson *et al.*, 2017).

Diferentes estudos têm relatado os efeitos terapêuticos do resveratrol em infecções por vírus respiratórios. Na infecção com o vírus sincicial respiratório, o tratamento com resveratrol reduziu o dano e o infiltrado inflamatório pulmonar. Além disso, o tratamento com resveratrol contribuiu para a modulação da imunidade inata ao reduzir a população de células NK nos pulmões, células responsáveis pela inflamação persistente e a hiperresponsividade das vias aéreas (AHR) (Zang *et al.*, 2011, 2015). Enquanto na infecção pelo vírus influenza H1N1, o tratamento com o pterostilbeno (PTE, trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxiestilbeno), um análogo dimetilado do resveratrol, mitigou eficazmente as alterações histopatológicas e lesões pulmonares induzidas pelos vírus. Esses efeitos benéficos foram atribuídos à supressão da inflamação, redução da apoptose de células epiteliais alveolares e da polarização dos macrófagos para o perfil M1 (Zhang *et al.*, 2024).

Observamos que apesar do ganho de peso em fêmeas K18-hACE2 CAF, às lesões pulmonares induzidas por SARS-CoV-2 nesses animais foram semelhantes as observadas em fêmeas do grupo dieta convencional. Estudos têm mostrado que camundongos fêmeas apresentam uma menor susceptibilidade a infecções virais respiratórias que está relacionada a diferenças na resposta imune e adaptativa, bem como na variação das concentrações de hormônios esteroides sexuais, o que têm sido debate em estudos, incluindo aqueles relacionados a infecções por coronavírus (Klien *et al.*, 2016; Channappanavar *et al.*, 2017; Scully *et al.*, 2020).

O estrogênio em camundongos fêmeas apresenta efeitos protetores em infecções virais, incluindo por SARS-CoV e SARS-CoV-2. Esse hormônio esteroide pode regular funções relacionadas ao metabolismo, inflamação e sistema imune inato e adaptativo (Channappanavar *et al.*, 2017; Dhakal *et al.*, 2021; Solis *et al.*, 2022). Além disso, estudos tem relatado uma maior susceptibilidade de animais machos à infecção por SARS-CoV e SARS-CoV-2 comparado com as fêmeas (Channappanavar *et al.*, 2017; Dhakal *et al.*, 2021; Ruiz-Bedoya *et al.*, 2022). Na infecção por SARS-CoV, os machos apresentaram títulos virais elevados, aumento da permeabilidade vascular e edema alveolar. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento no acúmulo de macrófagos monócitos inflamatórios e neutrófilos nos pulmões. Em fêmeas a ovariectomia ou o tratamento de com um antagonista do receptor de estrogênio resultou no aumento da mortalidade, indicando um efeito protetor

da sinalização do receptor de estrogênio em camundongos fêmeas infectadas com SARS-CoV (Channappanavar *et al.*, 2017).

No presente trabalho, observamos o aumento dos níveis das quimiocinas CCL2 e CXCL1 tanto no modelo de obesidade e infecção por MHV-A59 e aumento dos níveis de IL-6, CCL2 e CXCL1 no modelo de obesidade e infecção por SARS-CoV-2. De acordo com estudos, essa liberação aumentada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias é um fator complicador associado à gravidade das infecções respiratórias em indivíduos com comorbidades como a obesidade (McNeill *et al.*, 2021; Muscogiuri *et al.*, 2022). As citocinas IL-6 e TNF, assim como as quimiocinas MCP-1 (CCL2) e CXCL1 exercem um papel central na inflamação crônica observada na obesidade (Taylor, 2021), além de serem alguns dos marcadores de gravidade na COVID-19, cujos níveis se encontram aumentados e que participam da inflamação disfuncional na doença (Gomez-Escobar *et al.*, 2021).

A citocina IL-6 é produzida por uma variedade de células, incluindo adipócitos, macrófagos, músculo esquelético, células endoteliais e fibroblastos. Os macrófagos e adipócitos estão entre as principais fontes de produção de IL-6. Enquanto CCL2, uma potente proteína quimiotática, é principalmente produzida por macrófagos, células endoteliais e adipócitos. CXCL1, é um quimioatraente particularmente de neutrófilos produzido por macrófagos e células epiteliais e endoteliais (Sawant *et al.*, 2015). Esses mediadores pró-inflamatórios contribuem tanto para a inflamação sistêmica quanto na manutenção da inflamação no tecido adiposo visceral (Taylor, 2021; Yau, Wu e Qiu, 2022).

Nós também observamos que o resveratrol reduziu os níveis de CCL2 e CXCL1 em ambos os modelos de obesidade nas infecções com os betacoronavírus. Esse potencial anti-inflamatório do resveratrol têm sido relatados frente a uma variedade de citocinas e quimiocinas relacionadas tanto à obesidade quanto à infecção por vírus respiratórios.

Na infecção pelo vírus H1N1 em linhagem celular do epitélio pulmonar A549, o resveratrol reduziu os níveis IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, RANTES e TNF no sobrenadante de maneira dose-dependente. Como mecanismo, foi observado que a redução da inflamação ocorreu devido à ativação da via de sinalização composta pela proteína quinase ativada por AMP alfa fosforilada (P-AMPK α), sirtuina 1 (Sirt1) e coativador 1-alfa do PPAR γ (PGC1 α), resultando na inibição da sinalização de NF- κ B e da quinase ativada por mitógenos p38 (MAPK) (Zhang *et al.*, 2024). Essa redução da ativação do NF- κ B tem promovido redução da inflamação e a patologia pulmonar, aumentando a sobrevivência em modelos murinos infectados com SARS-CoV. Esses dados indicam que a ativação NF- κ B tem uma

contribuição importante para a inflamação induzida após a infecção por coronavírus (De Diego *et al.*, 2014).

O resveratrol também tem regulado positivamente a resposta dos interferons do tipo I, que são cruciais na resposta antiviral e na regulação da resposta imune inata, através do aumento da citocina IFN- β durante a infecção por vírus. Na infecção por influenza H1N1 e H3N2, o tratamento com o resveratrol aumentou a expressão de IFN- β através da via TLR9/IRF7, sugerindo que o IFN- β provavelmente agiu sinergicamente com o resveratrol para inibir a replicação do vírus (Lin *et al.*, 2015). Esses dados corroboram os achados do presente estudo, onde observamos que o tratamento com resveratrol manteve os níveis do IFN- β na infecção pelo vírus MHV-A59 em modelo de obesidade. Sugerimos que o resveratrol tem potencial terapêutico no modelo de obesidade e infecção por betacoronavírus murino, tanto por meio de seus efeitos anti-inflamatórios quanto pela manutenção da resposta antiviral mediada por IFN- β .

No presente estudo também observamos que o resveratrol promoveu a redução de diferentes parâmetros relacionados a danos e inflamação, incluindo o extravasamento de proteínas totais e morte celular pela diminuição dos níveis de lactato desidrogenase no BAL, bem como redução dos níveis de nitrito no pulmão dos animais CAF na infecção por MHV-A59. Estudos têm relatado efeitos protetores do resveratrol em diferentes doenças pulmonares. Em modelo inflamação pulmonar aguda em ratos, induzido pela inalação de fumaça de cigarro, a associação do resveratrol com a dexametasona reduziu a atividade de MPO e a peroxidação lipídica nos pulmões (Sadarani *et al.*, 2015). Enquanto no modelo de lesão pulmonar aguda (ALI) o tratamento com resveratrol levou a redução do número de neutrófilos e de proteína total no BAL (Tang *et al.*, 2022).

Nossos resultados demonstraram que tanto os animais CAF quanto os animais dieta convencional apresentaram um quadro de linfopenia na infecção por MHV-A59, que não foi revertido apesar do tratamento com resveratrol. A linfopenia é um dos fatores que pode comprometer as defesas do indivíduo frente a infecção por coronavírus. Os linfócitos T auxiliares CD4⁺ e os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ são fundamentais na resposta imunológica contra a infecção por SARS-CoV-2 (Antonioli *et al.*, 2020). Os linfócitos T CD4⁺ auxiliam as células B a produzir anticorpos antivirais, enquanto os linfócitos T CD8⁺ e as células natural killer (NK) matam as células infectadas pelo vírus para reduzir a carga viral (Jafarzadeh *et al.*, 2021). Além disso, no pulmão, os linfócitos T CD4⁺ respondem à proteína S do vírus, enquanto a expansão de linfócitos T CD8⁺ no lavado broncoalveolar

está relacionada com a moderação na gravidade da doença (Davitt *et al.*, 2022). No entanto, uma das características mais marcantes da disfunção imunológica na COVID-19 é a intensa depleção de linfócitos T CD4+ e CD8+, associada à gravidade da doença (Antonioli *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021). Estudos tem mostrado que contagens de linfócitos T em pacientes com COVID-19 são inversamente proporcionais às concentrações de IL-6, IL-10 e TNF. Essas citocinas e vias de sinalização foram identificadas como possíveis mecanismos para a exaustão e disfunção imunológica observadas na COVID-19 devido a ativação da apoptose nessas células (He *et al.*, 2021).

No presente estudo também observamos uma maior contagem de neutrófilos no BAL, pulmão e sangue, bem como uma maior razão de neutrófilos por linfócitos nos animais do grupo CAF na infecção com MHV-A59 comparado ao grupo dieta convencional, sugerindo a participação dessas células na gravidade da infecção em animais com obesidade. Esse aumento do número de neutrófilos também tem sido observado na COVID-19 e contribuído para a patogênese na doença ao exibirem uma atividade hiper inflamatória que pode ocasionar danos celulares significativos (Obermayer *et al.*, 2021; Gustine e Jones, 2021). O aumento dos neutrófilos, quando acompanhado de uma elevação na razão de neutrófilos por linfócitos (RNL), é considerado um biomarcador da resposta inflamatória sistêmica. O aumento da RNL tem sido associado a um pior prognóstico em diversas condições clínicas, incluindo a COVID-19, devido à sua correlação com a gravidade da inflamação e um desfecho clínico adverso (Sarkar, Khanna, Singh, 2022). Além disso, o aumento de neutrófilos no pulmão, recrutados pelo aumento dos níveis de IL-8 (CXCL1), pode levar ao aumento da inflamação através da formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET's), resultando na apoptose de células epiteliais e liberação de DAMPs que ao serem reconhecidos, estimulam outras células do sistema imune a produzir citocinas e quimiocinas (Davitt *et al.*, 2022).

Semelhante à COVID-19, na obesidade também é observado um aumento na circulação de neutrófilos e o aumento da RNL, com estudos apontando uma clara correlação entre a contagem elevada de neutrófilos no sangue e um maior índice de massa corporal (IMC) (Uribe-Querol e Rosales, 2022; Sanchez-Pino *et al.*, 2022). Além disso, a presença aumentada dos neutrófilos é observado tanto no sangue periférico quando no tecido adiposo de indivíduos com sobrepeso (Sanchez-Pino *et al.*, 2022) quanto em modelo experimental de obesidade (Baragetti *et al.*, 2023).

Nossos dados corroboram a literatura, confirmando o aumento de neutrófilos tanto no contexto de obesidade quanto na presença da infecção por coronavírus, apesar de isoladamente, devido à escassez de dados relacionando papel dos neutrófilos na obesidade e infecção por vírus respiratórios. Portanto, nossos resultados sugerem que o aumento dos neutrófilos circulantes e no tecido pulmonar, decorrente da infecção com MHV-A59 combinada à obesidade, pode contribuir para a maior gravidade da doença nesses animais, principalmente devido ao aumento da RNL, somado à inflamação crônica induzida pela obesidade. Esse processo leva a uma inflamação sistêmica exacerbada no modelo de obesidade, que é atenuada na presença do tratamento com resveratrol.

Em nosso estudo, também observamos que os neutrófilos derivados da medula óssea (BMDN) dos animais com obesidade, frente a infecção pelo vírus MHV-A59, apresentaram uma liberação de ROS mais acentuada comparada à liberação de ROS observada pelos neutrófilos dos animais dieta convencional infectados. De acordo com estudos, os neutrófilos de indivíduos obesos apresentam uma maior ativação, evidenciado por concentrações elevadas de mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE) no plasma e maior expressão de CD66b, um marcador de degranulação dos neutrófilos (Ali *et al.*, 2018). Além disso, a ativação dos neutrófilos em indivíduos obesos também está relacionada a estimulação da via de NF- κ B, uma maior geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Uribe-Querol e Rosales, 2022). No entanto, estudos têm demonstrado diferentes mecanismos do resveratrol em neutrófilos, dentre eles a redução da liberação MPO, ROS, elastase e degranulação de neutrófilos, além de prevenir a liberação de NET's (Tsai *et al.*, 2019; de Souza Andrade *et al.*, 2022).

Essas evidências sustentam os achados deste estudo, sugerindo uma possível disfunção nos neutrófilos, induzida pela obesidade e que é agravada pela infecção pelo vírus MHV-A59. Nesse contexto, nossos resultados sugerem que o aumento dos neutrófilos circulantes e no pulmão, acompanhado de uma ativação exacerbada dessas células, pode estar contribuindo para as lesões pulmonares e aumento da inflamação nesses animais. Esses efeitos, no entanto, podem estar sendo atenuados devido a modulação da inflamação e da redução do status de ativação dos neutrófilos, como a redução da liberação de ROS, pelo tratamento com resveratrol em modelo de obesidade e infecção por betacoronavírus murino.

Considerando que a adiposidade visceral é um fator de risco para formas graves de COVID-19 e desempenha um papel crucial na promoção da inflamação crônica observada na obesidade, investigamos a função desse tecido na infecção por coronavírus, bem como os

impactos do resveratrol na modulação da resposta inflamatória no tecido adiposo epididimal/gonadal dos animais com obesidade. Além disso, analisamos os efeitos do resveratrol nos parâmetros metabólicos relacionados à obesidade durante a infecção com os vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2. A,

No presente trabalho também observamos que o resveratrol regulou positivamente os níveis plasmáticos da adiponectina tanto nos animais CAF quanto nos animais DC durante a infecção com o vírus MHV-A59, enquanto reduziu os níveis plasmáticos da leptina e a expressão de TNF no tecido adiposo epididimal somente nos animais CAF na infecção viral. Em concordância com o aumento dos níveis de adiponectina, observamos que o tratamento com resveratrol reduziu significativamente os níveis plasmáticos de glicose nos animais CAF durante a infecção pelos vírus MHV-A59 e SARS-CoV-2. Esses achados sugerem que a regulação positiva dos níveis de adiponectina promovida pelo resveratrol pode ter contribuído para a diminuição dos níveis glicêmicos nos animais com obesidade.

De acordo com estudos, esse papel no aumento da adiponectina pelo resveratrol está relacionado a sua capacidade de ativar o eixo AMPK–SIRT1–PGC-1 α que resulta no aumento da expressão dos receptores de adiponectina AdipoR1 e AdipoR2 (Park *et al.*, 2016). O aumento da expressão desses receptores de adiponectina, devido à ativação de AMPK e PGC-1 α , contribui para a redução dos níveis glicêmicos e de insulina ao aumentar a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana celular, promovendo maior captação de glicose pelo músculo esquelético. A ativação da AMPK pelo AdipoR1 leva à indução do PGC-1 α , um cofator chave na regulação do metabolismo energético, que favorece a sensibilidade à insulina e o uso da glicose (Mandal *et al.*, 2010; Khoramipour *et al.*, 2021).

A adiponectina é uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias, presente em maiores concentrações plasmáticas no organismo e desempenha diversas funções essenciais no metabolismo, incluindo a regulação dos níveis de glicose, o metabolismo de lipídios e auxilia na regulação da sensibilidade à insulina (Nguyen, 2020). No entanto, em indivíduos metabolicamente não saudáveis, especialmente na presença de obesidade, os níveis circulantes de adiponectina se encontram reduzidos. Ao contrário da adiponectina, os níveis da leptina, uma adipocina pró-inflamatória, se encontram aumentados durante a obesidade (Taylor, 2021). Tem sido observado que a adiponectina tem efeitos benéficos em doenças pulmonares, incluindo a redução do risco de doença pulmonar intersticial e fibrose pulmonar

idiopática (Zielinski *et al.*, 2023), enquanto níveis aumentados da leptina contribuiu para gravidade de doenças pulmonares (Jutant *et al.*, 2021).

A leptina é fundamental para a regulação da homeostase energética e de outros processos no organismo, incluindo o controle da saciedade, gasto energético pode afetar muitos aspectos das funções das células do sistema imune e resposta inflamatória (Scheja e Heeren, 2019). Na obesidade, a hiperleptinemia e a exposição prolongada a níveis elevados de leptina podem contribuir para um estado inflamatório crônico, comprometendo a sinalização da insulina, principalmente devido à ação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020; Obradovic *et al.*, 2021; Barrios *et al.*, 2022). Essa ativação da inflamação pela leptina ocorre principalmente por meio das vias de sinalização envolvendo NF- κ B, STAT1/3 e MAPK, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imunológico (Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Dentre as células que podem ser ativadas estão os neutrófilos, nos quais o aumento da leptina pode induzir quimiotaxia e ativação, além de estimular a proliferação de monócitos, a expressão de citocinas inflamatórias (TNF e IL-6) e a exibição de marcadores de ativação na superfície celular (Taylor, 2021).

Nossos resultados demonstraram o aumento dos níveis plasmáticos de leptina e da expressão de TNF no tecido adiposo visceral em ambos os modelos de obesidade e infecção por betacoronavírus. Esses resultados corroboram os achados da literatura que reportam tanto o aumento de leptina quanto de TNF durante a obesidade. Nesse contexto, tanto os adipócitos quanto os macrófagos residentes no tecido adiposo contribuem para a produção dessa citocina que está relacionada à manutenção da inflamação crônica e à resistência à insulina na obesidade (Taylor, 2021). Além disso, não só o aumento de TNF, mas também de outros mediadores inflamatórios como IL-6, e MIP-2 (CCL2) circulante têm sido relacionados com a resistência à insulina devido a ativação de vias de sinalização inflamatórias na obesidade, incluindo MAPK e NF- κ B, que, por sua vez, alteram a fosforilação do IRS-1 (Substrato do Receptor de Insulina 1), prejudicando a sinalização da insulina (Yau, Wu e Qiu, 2022).

No presente trabalho, demonstramos que o resveratrol melhorou os parâmetros metabólicos relacionados à obesidade, incluindo os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicérides em ambos os modelos de obesidade e infecção por betacoronavírus. Os efeitos benéficos do resveratrol sobre parâmetros metabólicos no contexto de obesidade também têm sido relatos em outros estudos. Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, um

composto químico seletivamente tóxico para as células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans, o tratamento com resveratrol regulou a glicemia e reduziu a inflamação por meio da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da diminuição dos níveis de IL-6 e TNF, ao modular NF- κ B (Nahavandi *et al.*, 2023; Alanazi *et al.*, 2024). Além da glicemia, o resveratrol também tem promovido a redução dos níveis de colesterol e triglicérides em modelos experimentais de obesidade (Montero *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2018). Desse modo, essas evidências corroboram os achados deste trabalho, confirmando que o resveratrol tem um potencial terapêutico na obesidade e em condições metabólicas associadas, por meio de seus efeitos anti-inflamatórios e na normalização de parâmetros metabólicos.

Notavelmente, no presente estudo observamos o aumento dos títulos virais no tecido adiposo em ambos os modelos de obesidade tanto na infecção por MHV-A59 quanto por SARS-CoV-2. No entanto, o resveratrol foi capaz de reduzir os títulos virais de MHV-A59 no tecido adiposo epididimal dos animais CAF, apesar de não ter efeito sobre os títulos virais de SARS-CoV-2 no tecido adiposo gonadal dos animais K18-hACE2 CAF.

Estudos têm mostrado que o vírus SARS-CoV-2 pode infectar células do tecido adiposo humano, incluindo os adipócitos e macrófagos residentes do tecido adiposo, levando a uma resposta inflamatória local e resultando em mudanças no perfil lipídico. Essas células de gordura visceral expressam mais o receptor ECA2 e são mais suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2 do que os tecidos adiposos subcutâneos. Desse modo, o tecido adiposo visceral pode servir de reservatório para armazenamento e replicação do vírus, além de ser um local de amplificação de citocinas (Saccon *et al.*, 2022; Martínez-Colón *et al.*, 2022).

Nossos resultados sugerem que o resveratrol, ao modular a inflamação, promoveu efeitos antivirais indiretos, resultando na redução dos títulos do vírus MHV-A59 no tecido adiposo visceral dos animais com obesidade, apesar de ter não reduzido os títulos virais de SARS-CoV-2 no tecido adiposo dos animais K18-hACE2 com obesidade. Além disso, por meio de seus efeitos anti-inflamatórios, o resveratrol diminuiu os níveis plasmáticos de mediadores pró-inflamatórios analisados envolvidos na manutenção do estado inflamatório na obesidade, ao mesmo tempo em que melhorou os parâmetros metabólicos nos animais obesos infectados pelos betacoronavírus.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os achados desse estudo, em modelos de obesidade e infecção por betacoronavírus, demonstram que os fármacos atorvastatina, dasatinibe e o composto resveratrol apresentam efeitos protetores, evidenciados pela redução da replicação viral e da produção de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, o resveratrol foi capaz de modular a resposta inflamatória e melhorar os parâmetros metabólicos, reduzindo a gravidade da doença e favorecendo a capacidade dos animais CAF de lidar com a infecção, mesmo na presença da obesidade. Em conjunto, nossos resultados revelaram que a atorvastatina, o dasatinibe e o resveratrol têm potencial para o reposicionamento como terapias adjuvantes no manejo de infecções por betacoronavírus.

7. REFERÊNCIAS

1. ABDALLA, Maha et al. Dasatinib inhibits TGF β -induced myofibroblast differentiation through Src-SRF Pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 769, p. 134-142, 2015.
2. ALANAZI, Ahmed Z. et al. Cardioprotective effects of liposomal resveratrol in diabetic rats: unveiling antioxidant and anti-inflammatory benefits. *Redox Report*, v. 29, n. 1, p. 2416835, 2024. <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2416835>
3. AL HAJJAR, Sami; MEMISH, Ziad A.; MCINTOSH, Kenneth. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): infection, immunological response, and vaccine development. *Journal of Immunology Research*, v. 2019, 2019.
4. ALIMOHAMADI, Yousef et al. Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, v. 61, n. 3, p. E304, 2020.
5. ANDRADE, ACDSP; CAMPOLINA-SILVA, GH; QUEIROZ-JUNIOR, CM; OLIVEIRA, LC; LACERDA, L de SB; GAGGINO, JCP et al. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. *Journal of Virology*, v. 95, n. 22, p. e0127621, 2021.
6. ANTONIOLI, L. et al. NKG2A and COVID-19: Another brick in the wall. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 6, p. 672-674, 2020.
7. BADAR, Vandana A. et al. The effect of atorvastatin on lung function and sputum cell count in chronic asthma patients. *Int J Pharmacol Res*, v. 4, p. 194-198, 2014.
8. BATISTA-JORGE, G. C. et al. Oral resveratrol supplementation improves metabolic syndrome features in obese patients submitted to a lifestyle-changing program. *Life Sciences*, v. 256, p. 117962, 2020.
9. BAEK, Seung Ho et al. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. *Phytomedicine*, v. 23, n. 5, p. 566-577, 2016.
10. BAGNATO, Giulia et al. Nuclear functions of the tyrosine kinase Src. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2675, 2020.
11. BARAGETTI, A. et al. Neutrophil aging exacerbates high fat diet induced metabolic alterations. *Metabolism*, v. 144, p. 155576, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2023.155576>

12. BARTOLETTI, M. et al. ESCMID COVID-19 living guidelines: Drug treatment and clinical management. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 28, n. 2, p. 222-238, 2022.
13. BARRIOS, Vicente et al. Chronic central leptin infusion promotes an anti-inflammatory cytokine profile related to the activation of insulin signaling in the gastrocnemius of male rats. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1465, 2022.
14. BEGUM, Mahmuda et al. Adiponectin: a promising target for the treatment of diabetes and its complications. **Life**, v. 13, n. 11, p. 2213, 2023.
15. BEYERSTEDT, Stephany; CASARO, Expedito Barbosa; RANGEL, Érika Bevilaqua. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 40, n. 5, p. 905-919, 2021.
16. BHANUMATHY, K.K. et al. Protein tyrosine kinases: their roles and their targeting in leukemia. *Cancers*, v. 13, n. 2, p. 184, 2021. doi: 10.3390/cancers13020184.
17. BIGAGLI, Elisabetta et al. Nutritionally relevant concentrations of resveratrol and hydroxytyrosol mitigate oxidative burst of human granulocytes and monocytes and the production of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*, v. 43, p. 147-155, 2017.
18. BONI, Maciej F. et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 1408-1417, 2020.
19. BOUZID, H el ene et al. Targeting macrophage and immune responses in viral infections: a therapeutic opportunity. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 614867, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.614867>
20. BROECKEL, R. et al. Src family kinase inhibitors block translation of alphavirus subgenomic mRNAs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 63, n. 4, 2019. doi: 10.1128/AAC.02325-18.
21. BURKARD, C., VERHEIJE, M. H., VAN-KUPPEVELD, F. J. M. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner. *PLOS Pathogens*, v. 10, n. 11, e1004502, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004502>
22. CASCELLA, M. Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). 2020.
23. CHAKRABORTY, C. et al. The drug repurposing for COVID-19 clinical trials provide very effective therapeutic combinations: Lessons learned from major clinical studies. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 704205, 2021.

24. CHANNAPPANAVAR, Rudragouda et al. Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 10, p. 4046-4053, 2017.
25. CHEN, Xiaojun et al. Effect of statins on pulmonary function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Thoracic Disease*, v. 15, n. 7, p. 3944, 2023.
26. CHEN, S. et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, p. 207, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01052-2>
27. CHENG, K. et al. Analysis of influence of baicalin joint resveratrol retention enema on the TNF- α , SIgA, IL-2, IFN- γ of rats with respiratory syncytial virus infection. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 70, n. 2, p. 1305-1309, 2014.
28. CHOUDHURY, Abhigyan; MUKHERJEE, Suprabhat. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 10, p. 2105-2113, 2020.
29. CHU, H. et al. Coronaviruses exploit a host cysteine-aspartic protease for replication. *Nature*, v. 609, n. 7928, p. 785-792, 2022.
30. Coleman CM, Sisk JM, Mingo RM, et al. Abelson kinase inhibitors are potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus and Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion. *J Virol* 90:8924-8933, 2016. <https://doi.org/10.1128/jvi.01429-16>
31. CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.
32. DAI, Jiayu et al. Toll-like receptor signaling in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-induced innate immune responses and the potential application value of toll-like receptor immunomodulators in patients with coronavirus disease 2019. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 948770, 2022.
33. DAVITT, E. et al. COVID-19 disease and immune dysregulation. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 35, n. 3, p. 101401, 2022.
34. DAVIS, John W. et al. Statin use and the risk of venous thromboembolism in women taking hormone therapy. **JAMA network open**, v. 6, n. 12, p. e2348213-e2348213, 2023.
35. DEDIEGO, Marta L. et al. Inhibition of NF- κ B-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. **Journal of virology**, v. 88, n. 2, p. 913-924, 2014.

36. DELGADO, Juan F. et al. SARS-CoV-2 spike protein vaccine-induced immune imprinting reduces nucleocapsid protein antibody response in SARS-CoV-2 infection. *Journal of Immunology Research*, v. 2022, n. 1, p. 8287087, 2022.
37. DE JESÚS-GONZÁLEZ, Luis Adrián et al. A dual pharmacological strategy against COVID-19: The therapeutic potential of metformin and atorvastatin. *Microorganisms*, v. 12, n. 2, p. 383, 2024.
38. DE PAULA, Talles Prospero et al. Treatment with atorvastatin provides additional benefits to imipenem in a model of gram-negative pneumonia induced by *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 5, p. 10.1128/aac.00764-17, 2018.
39. DE WISPELAERE, M., LACROIX, A. J., YANG, P. L. The small molecules AZD0530 and dasatinib inhibit dengue virus RNA replication via Fyn kinase. *Journal of Virology*, v. 87, p. 7367–81, 2013. <https://doi.org/10.1128/JVI.00632-13>
40. DHAKAL, Santosh et al. Sex differences in lung imaging and SARS-CoV-2 antibody responses in a COVID-19 golden Syrian hamster model. *MBio*, v. 12, n. 4, p. 10.1128/mbio.00974-21, 2021.
41. DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 827, 2020.
42. DOS REIS COSTA, Daniela Esteves Ferreira et al. Contribution of RAS, ROS and COX-1-derived prostanoids to the contractile profile of perivascular adipose tissue in cafeteria diet-induced obesity. *Life sciences*, v. 309, p. 120994, 2022.
43. DYALL, J., GROSS, R., KINDRACHUK, J. et al. Repurposing of clinically developed drugs for treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, p. 4885-4893, 2014. <https://doi.org/10.1128/aac.03036-14>
44. ELEMENTO, Olivier. The road from Rous sarcoma virus to precision medicine. *Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 4, 2021.
45. EPISCOPIO, D. et al. Atorvastatin restricts the ability of influenza virus to generate lipid droplets and severely suppresses the replication of the virus. *The FASEB Journal*, v. 33, n. 8, p. 9516, 2019. <https://doi.org/10.1096/fj.201902369>
46. ESFANDIAREI, M. et al. Beneficial effects of resveratrol and exercise training on cardiac and aortic function and structure in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 1197-1211, 2019.
47. ESPAÑO, Erica et al. Lipophilic statins inhibit Zika virus production in Vero cells. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 11461, 2019.

48. FANG, W.-j. et al. Resveratrol alleviates diabetic cardiomyopathy in rats by improving mitochondrial function through PGC-1 α deacetylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 39, n. 1, p. 59-73, 2018.
49. FERNÁNDEZ-RIEJOS, Patricia et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators of inflammation**, v. 2010, n. 1, p. 568343, 2010.
50. FERREIRA, Thiago Santos et al. Oxidative stress and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin on lungs from mice exposed to cigarette smoke. *Inflammation*, v. 37, p. 1355-1365, 2014.
51. FILARDO, S. et al. Therapeutic potential of resveratrol against emerging respiratory viral infections. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 214, p. 107613, 2020.
52. FIORAVANTI, R. et al. Effects of polyphenol compounds on influenza A virus replication and definition of their mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 16, p. 5046-5052, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.06.036>
53. FRANCO-PELÁEZ, Juan Antonio et al. Statin use is associated with reduced mortality after respiratory viral infection. *ERJ Open Research*, v. 7, n. 1, 2021.
54. GALANI, I.-E. et al. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nature Immunology*, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2021.
55. GARCIA, A. B. et al. Coding-Complete Genome Sequence of Murine Hepatitis Virus Strain 3 from Brazil. *Microbiological Resource Announcements*, v. 10, n. 15, e00248-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/MRA.00248-21>
56. GAVRIATOPOULOU, M. et al. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 21, p. 167-179, 2021.
57. GIORDO, Roberta et al. Therapeutic potential of resveratrol in COVID-19-associated hemostatic disorders. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 856, 2021.
58. GOMEZ-ESCOBAR, Luis G. et al. Cytokine signatures of end organ injury in COVID-19. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 12606, 2021.
59. GONZÁLEZ-HERRERA, Fabiola et al. Statins change the cytokine profile in *Trypanosoma cruzi*-infected U937 macrophages and murine cardiac tissue through Rho-associated kinases inhibition. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 1035589, 2023.
60. GORABI, A. M. et al. Antiviral effects of statins. *Progress in Lipid Research*, v. 79, p. 101054, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101054>
61. GÖTZ, Lisa et al. The role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in cancer. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1295232, 2023.

62. GUPTE, Manisha et al. ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 3, p. R781-R788, 2008.
63. GUPTA, Aakriti et al. Association between antecedent statin use and decreased mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1325, 2021.
64. GUPTA, Shruti et al. Association between early treatment with tocilizumab and mortality among critically ill patients with COVID-19. **JAMA internal medicine**, v. 181, n. 1, p. 41-51, 2021.
65. GUO, Lin et al. Therapeutic Role and Potential Mechanism of Resveratrol in Atherosclerosis: TLR4/NF- κ B/HIF-1 α . *Mediators of Inflammation*, v. 2023, n. 1, p. 1097706, 2023.
66. GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of hyperinflammation in COVID-19. *The American Journal of Pathology*, v. 191, n. 1, p. 4-17, 2021.
67. HAMEED, Muddassar et al. Immune response to arbovirus infection in obesity. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 968582, 2022.
68. HASSAN, Nabila ME et al. Dasatinib mitigates renal fibrosis in a rat model of UUO via inhibition of Src/STAT-3/NF- κ B signaling. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 84, p. 103625, 2021.
69. HE, L. et al. Single-cell analysis reveals cell communication triggered by macrophages associated with the reduction and exhaustion of CD8⁺ T cells in COVID-19. *Cell Communication and Signaling*, v. 19, n. 1, p. 73, 2021.
70. HE, YongHong et al. Effects of atorvastatin in suppressing pulmonary vascular remodeling in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics*, v. 78, p. 100252, 2023.
71. HORVAT, J. C. et al. Neonatal chlamydial infection induces mixed T-cell responses that drive allergic airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 176, n. 6, p. 556-564, 2007.
72. HOU, W. et al. Small GTPase—A key role in host cell for Coronavirus infection and a potential target for Coronavirus vaccine adjuvant discovery. *Viruses*, v. 14, n. 9, p. 2044, 2022. <https://doi.org/10.3390/v14092044>
73. HUANG, Kao-Jean et al. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. *Journal of Medical Virology*, v. 75, n. 2, p. 185-194, 2005.

74. JAFARZADEH, Abdollah et al. Lymphopenia an important immunological abnormality in patients with COVID-19: possible mechanisms. *Scandinavian journal of immunology*, v. 93, n. 2, p. e12967, 2021.
75. JAYAWEERA, Mahesh et al. Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environmental Research*, v. 188, p. 109819, 2020.
76. JIANG, Y. et al. Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 171, n. 8, p. 850-857, 2005.
77. JUNQUEIRA, C. et al. FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*, v. 606, n. 7914, p. 576-584, 2022.
78. JUTANT, E.-M. et al. The thousand faces of leptin in the lung. *Chest*, v. 159, n. 1, p. 239-248, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.10.002>
79. KAGIOS, Christakis et al. Cafeteria diet and caloric restriction affect metabolic but not behavioral characteristics in male Wistar rats. *Physiology & Behavior*, v. 288, p. 114731, 2025.
80. KARLSSON, E. A. et al. A perfect storm: increased colonization and failure of vaccination leads to severe secondary bacterial infection in influenza virus-infected obese mice. *mBio*, v. 8, e00889-17, 2017. <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-17>
81. KHORAMIPOUR, Kayvan et al. Adiponectin: Structure, physiological functions, role in diseases, and effects of nutrition. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1180, 2021.
82. KRÄMER, B. et al. Early IFN-α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. *Immunity*, v. 54, n. 11, p. 2650-2669. e14, 2021.
83. KUMAR, Ratan et al. Association of leptin with obesity and insulin resistance. **Cureus**, v. 12, n. 12, 2020.
84. LAFORGE, Mireille et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 9, p. 515-516, 2020.
85. LARSEN, Carsten Schade. Assessing the proportion of the Danish population at risk of clinically significant drug-drug interactions with new oral antivirals for early treatment of COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 599-601, 2022.
86. LEIBOWITZ, Julian L. et al. Genetic determinants of mouse hepatitis virus strain 1 pneumovirulence. *Journal of Virology*, v. 84, n. 18, p. 9278-9291, 2010.

87. LEE, Christopher Seungkyu et al. Resveratrol inhibits hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and pathological neovascularization. *Yonsei Medical Journal*, v. 56, n. 6, p. 1678-1685, 2015.
88. LI, Meng-Yuan et al. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 9, n. 02, p. 23-29, 2020.
89. LI, Guangdi et al. Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 22, n. 6, p. 449-475, 2023.
90. LIN, X. et al. Obesity: epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 706978, 2021. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
91. LIM, Sarah et al. Prevalence of medical contraindications to nirmatrelvir/ritonavir in a cohort of hospitalized and nonhospitalized patients with COVID-19. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2022. p. ofac389.
92. LIU, Y.-L. et al. Polydatin prevents bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the TGF β /Smad/ERK signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 20, n. 5, p. 1-1, 2020.
93. LIN, Chao-jen et al. Polygonum cuspidatum and its active components inhibit replication of the influenza virus through toll-like receptor 9-induced interferon beta expression. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117602, 2015.
94. LONG, X. et al. NK cells contribute to persistent airway inflammation and AHR during the later stage of RSV infection in mice. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 205, p. 459-470, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0452-7>
95. LUI, G.; GUARALDI, G. Drug treatment of COVID-19 infection. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 29, n. 3, p. 174-183, 2023.
96. MAHALLAWI, Waleed H. et al. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile. *Cytokine*, v. 104, p. 8-13, 2018.
97. MAJUMDER, Nairrita et al. Redox imbalance in COVID-19 pathophysiology. *Redox Biology*, v. 56, p. 102465, 2022.
98. MANDAL, Palash; PRITCHARD, Michele T.; NAGY, Laura E. Anti-inflammatory pathways and alcoholic liver disease: role of an adiponectin/interleukin-10/heme oxygenase-1 pathway. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 11, p. 1330, 2010.
99. MARTÍNEZ-COLÓN, G. J. et al. SARS-CoV-2 infection drives an inflammatory response in human adipose tissue through infection of adipocytes and macrophages. *Science Translational Medicine*, v. 14, n. 674, p. eabm9151, 2022.

100. MARTÍNEZ-GUTIERREZ, Marlén; CASTELLANOS, Jaime E.; GALLEGO-GÓMEZ, Juan C. Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology*, v. 54, n. 4, p. 202-216, 2011.
101. MARTINEZ-GUTIERREZ, Marlen et al. Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. *PloS one*, v. 9, n. 2, p. e87412, 2014.
102. MCKENNA, E. et al. Neutrophils in COVID-19: not innocent bystanders. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 864387, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.864387>
103. MCNEILL, Jenna N. et al. The role of obesity in inflammatory markers in COVID-19 patients. *Obesity research & clinical practice*, v. 15, n. 1, p. 96-99, 2021.
104. MEIDANINIKJEH, S. et al. Monocytes and macrophages in COVID-19: Friends and foes. *Life Sciences*, v. 269, p. 119010, 2021.
105. MENG, Tiantian et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. *Molecules*, v. 26, n. 1, p. 229, 2021.
106. MERAD, M., MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 6, p. 355-362, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0341-5>
107. MIN, S. et al. Abl tyrosine kinase regulates hepatitis C virus entry. *Front Microbiol.*, v. 8, p. 1129, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01129.
108. MINKOFF, Judith M.; TENOEVER, Benjamin. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 178-194, 2023.
109. MINZ, Madhu Mary; BANSAL, Manish; KASLIWAL, Ravi R. Statins and SARS-CoV-2 disease: Current concepts and possible benefits. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 14, n. 6, p. 2063-2067, 2020.
110. MOHANDAS, S. et al. Immune mechanisms underlying COVID-19 pathology and post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC). *Elife*, v. 12, p. e86014, 2023.
111. MONTERO, M. et al. Effects of long-term feeding of the polyphenols resveratrol and kaempferol in obese mice. *PLOS One*, v. 9, n. 11, e112825, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112825>
112. MUBARAK, Ayman; ALTURAIKI, Wael; HEMIDA, Maged Gomaa. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): infection, immunological response, and vaccine development. *Journal of immunology research*, v. 2019, n. 1, p. 6491738, 2019.

113. MURTHY, Santosh B. et al. Antithrombotic and statin prescription after intracerebral hemorrhage in the Get With The Guidelines-Stroke registry. **Stroke**, v. 54, n. 12, p. 2972-2980, 2023.
114. MUSCOGIURI, Giovanna et al. Low-grade inflammation, CoVID-19, and obesity: clinical aspect and molecular insights in childhood and adulthood. **International Journal of Obesity**, v. 46, n. 7, p. 1254-1261, 2022.
115. NAHAVANDI, S. et al. Long-term resveratrol administration improves diabetes-induced pancreatic oxidative stress, inflammatory status, and β cell function in male rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 59, e21468, 2023. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902023000721468>
116. NAIK, Rajashri R. et al. Kinase inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COVID-19. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 806568, 2022.
117. NAJAFIYAN, B. et al. Unveiling the potential effects of resveratrol in lung cancer treatment: Mechanisms and nanoparticle-based drug delivery strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 172, p. 116207, 2024.
118. NOGALSKI, M.T. et al. The HCMV gH/gL/UL128–131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes. *PLoS Pathog.*, v. 9, p. 1003463, 2013.
119. NUNEMAKER, C. S. et al. Increased serum CXCL1 and CXCL5 are linked to obesity, hyperglycemia, and impaired islet function. *Journal of Endocrinology*, v. 222, n. 2, p. 267-276, 2014. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0357>
120. OBERMAYER, Astrid et al. Neutrophil extracellular traps in fatal COVID-19-associated lung injury. **Disease markers**, v. 2021, n. 1, p. 5566826, 2021.
121. OLIVEIRA, Marina C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*, v. 21, n. 9, p. E396-E406, 2013.
122. OTIENO, James R. et al. Origins and evolution of seasonal human coronaviruses. *Viruses*, v. 14, n. 7, p. 1551, 2022.
123. OSUNA-RAMOS, Juan Fidel et al. Cholesterol-lowering drugs as potential antivirals: a repurposing approach against flavivirus infections. **Viruses**, v. 15, n. 7, p. 1465, 2023.
124. PEREIRA, Rafaela das Dores et al. A 5-Lipoxygenase Inhibitor, Zileuton, Modulates Host Immune Responses and Improves Lung Function in a Model of Severe Acute

- Respiratory Syndrome (SARS) Induced by Betacoronavirus. *Viruses*, v. 15, n. 10, p. 2049, 2023.
125. PIMENTA, Jordane Clarisse et al. Neuropsychiatric sequelae in an experimental model of post-COVID syndrome in mice. *bioRxiv*, p. 2024.01. 10.575003, 2024.
126. PETROSILLO, Nicola et al. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related?. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 6, p. 729-734, 2020.
127. O'BRIEN, K. B. et al. Impaired wound healing predisposes obese mice to severe influenza virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 205, n. 2, p. 252-261, 2012. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir745>
128. OBRADOVIC, M. et al. Leptin and obesity: Role and clinical implication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 585887 [em linha]. 2021.
- 129.
130. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS). Perguntas frequentes: vacinas contra a COVID-19. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/vacinas-contra-covid-19/perguntas-frequentes-vacinas-contra-covid-19>. Acesso em: 12 de novembro de 2024.
131. Organização Mundial da Saúde (OMS). Eficácia, efetividade e proteção das vacinas. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/vaccine-efficacy-effectiveness-and-protection>. Acesso em: 12 de novembro de 2024.
132. ORTIZ, Maria A. et al. Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. **Cell Communication and Signaling**, v. 19, n. 1, p. 67, 2021.
133. PAIXÃO, E. S. et al. CoronaVac vaccine is effective in preventing symptomatic and severe COVID-19 in pregnant women in Brazil: A test-negative case-control study. *BMC Medicine*, v. 20, n. 1, p. 146, 2022.
134. PALAMARA, Anna T. et al. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 10, p. 1719-1729, 2005.
135. PANT, A. et al. Alteration in cellular signaling and metabolic reprogramming during viral infection. *mBio*, v. 12, n. 5, p. e00635-21, 2021. <https://doi.org/10.1128/mbio.00635-21>
136. PROTO, M. C. et al. Lipid homeostasis and mevalonate pathway in COVID-19: Basic concepts and potential therapeutic targets. *Progress in Lipid Research*, v. 82, p. 101099, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101099>

137. PUJOL, C. A. et al. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, n. 4, p. 412-416, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.014>
138. REEVES, P. M. et al. Variola and monkeypox viruses utilize conserved mechanisms of virion motility and release that depend on abl and SRC family tyrosine kinases. *Journal of Virology*, v. 85, p. 21-31, 2011. <https://doi.org/10.1128/JVI.01814-10>
139. REIS, Clarisse Giovana Maciel et al. Short-term cafeteria diet is associated with fat mass accumulation, systemic and amygdala inflammation, and anxiety-like behavior in adult male wistar rats. **Neuroscience**, v. 515, p. 37-52, 2023.
140. RICHARD, Allison J. et al. Adipose tissue: physiology to metabolic dysfunction. *Endotext* [Internet], 2020.
141. RIGON, R. B. et al. Quantification of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles by a validated reverse-phase HPLC photodiode array. *Applied Sciences*, v. 9, n. 22, p. 4961, 2019.
142. RODRÍGUEZ-MORA, S. et al. Dasatinib interferes with HIV-1 proviral integration and the inflammatory potential of monocyte-derived macrophages from people with HIV. *Biochemical Pharmacology*, p. 116512, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116512>
143. RONG, Na; WEI, Xiaohui; LIU, Jiangning. The role of neutrophil in COVID-19: positive or negative. **Journal of Innate Immunity**, v. 16, n. 1, p. 80-95, 2024.
144. ROUS, Peyton. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 13, n. 4, p. 397, 1911.
145. ROUAULT, C. et al. Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology*, v. 154, n. 3, p. 1069-1079, 2013. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2139>
146. RUSSO, C. et al. Comparison of vitamin D and resveratrol performances in COVID-19. *Nutrients*, v. 15, n. 11, p. 2639, 2023.
147. SADARANI, Bhakti N.; MAJUMDAR, Anuradha S. Resveratrol potentiates the effect of dexamethasone in rat model of acute lung inflammation. **International immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 773-779, 2015.
148. SARKAR, S. et al. The impact of neutrophil-lymphocyte count ratio in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Intensive Care Medicine*, v. 37, n. 7, p. 857-869, 2022. <https://doi.org/10.1177/08850666221107659>

149. SAWANT, Kirti V. et al. Chemokine CXCL1-mediated neutrophil trafficking in the lung: role of CXCR2 activation. **Journal of innate immunity**, v. 7, n. 6, p. 647-658, 2015.
150. SCHEJA, Ludger; HEEREN, Joerg. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 9, p. 507-524, 2019.
151. SCHULZ, Abigail et al. Adverse effects of remdesivir for the treatment of acute COVID-19 in the pediatric population: a retrospective observational study. **Molecular and Cellular Pediatrics**, v. 11, n. 1, p. 2, 2024.
152. SEFIK, E. et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature*, v. 606, n. 7914, p. 585–593, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04802-1>
153. SERAFIN, M. B. et al. Drug repositioning is an alternative for the treatment of coronavirus COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 6, p. 105969, 2020.
154. SISK, J. M. et al. Coronavirus S protein-induced fusion is blocked prior to hemifusion by Abl kinase inhibitors. *Journal of General Virology*, v. 99, p. 619, 2018. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001047>
155. SHANG, Jian et al. Structure of mouse coronavirus spike protein complexed with receptor reveals mechanism for viral entry. *PLoS Pathogens*, v. 16, n. 3, p. e1008392, 2020.
156. SHAO, Nan et al. Molecular evolution of human coronavirus-NL63, -229E, -HKU1 and -OC43 in hospitalized children in China. *Frontiers Microbiology*, v. 54, n. 4, p. 254-259, 2022.
157. SHARMA, Atul et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): a global pandemic and treatment strategies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 56, n. 2, p. 106054, 2020.
158. SHEMESH, Maya et al. SARS-CoV-2 suppresses IFN β production mediated by NSP1, 5, 6, 15, ORF6 and ORF7b but does not suppress the effects of added interferon. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 8, p. e1009800, 2021.
159. SHRIVASTAVA-RANJAN, Punya et al. Statins suppress Ebola virus infectivity by interfering with glycoprotein processing. **MBio**, v. 9, n. 3, p. 10.1128/mbio.00660-18, 2018.
160. SIRICO, Felice et al. Effects of physical exercise on adiponectin, leptin, and inflammatory markers in childhood obesity: systematic review and meta-analysis. *Childhood Obesity*, v. 14, n. 4, p. 207-217, 2018.

161. SOLIS, O. et al. The SARS-CoV-2 spike protein binds and modulates estrogen receptors. *bioRxiv* [Preprint]. 2022 May 23: 2022.05. 21.492920. 10.1101/2022.05.21.492920. **Update in: Sci Adv**, 2022.
162. TANG, Yin et al. The therapeutic efficacy of resveratrol for acute lung injury—A meta-analysis of preclinical trials. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 963245, 2022.
163. TAYLOR, Erin B. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clinical Science*, v. 135, n. 6, p. 731-752, 2021.
164. TISEO, Giusy et al. Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir, molnupiravir, and remdesivir in a real-world cohort of outpatients with COVID-19 at high risk of progression: the PISA outpatient clinic experience. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 12, n. 1, p. 257-271, 2023.
165. TSCHOP, M. et al. Resveratrol and its effects on metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 15, n. 9, p. 503-512, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-016>
166. TSHIVHASE, A. M.; MATSHA, T.; RAGHUBEER, S. Resveratrol attenuates high glucose-induced inflammation and improves glucose metabolism in HepG2 cells. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 1106, 2024.
167. VAN DER SLUIS, R. M. et al. TLR2 and TLR7 mediate distinct immunopathological and antiviral plasmacytoid dendritic cell responses to SARS-CoV-2 infection. *The EMBO Journal*, v. 41, n. 10, p. e109622, 2022.
168. VAN PAASSEN, J. et al. Corticosteroid use in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis on clinical outcomes. *Critical Care*, v. 24, p. 1-22, 2020.
169. VAN BRUMMELEN, R.; VAN BRUMMELEN, A. C. The potential role of resveratrol as supportive antiviral in treating conditions such as COVID-19—a formulator’s perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 148, p. 112767, 2022.
170. VAZQUEZ, Christine et al. SARS-CoV-2 viral proteins NSP1 and NSP13 inhibit interferon activation through distinct mechanisms. **PloS one**, v. 16, n. 6, p. e0253089, 2021.
171. VELÁSQUEZ, P. A. et al. Effectiveness of drug repurposing and natural products against SARS-CoV-2: A comprehensive review. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, p. 1-25, 2024.
172. VONG, L.; SHERMAN, P. M.; GLOGAUER, M. Chapter 5 - Quantification and Visualization of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) from Murine Bone Marrow-Derived Neutrophils. In: ALLEN, Irving C. (ed.). *Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology, v. 1031, p. 41. 2013.

173. WANG, Yong; MAO, Qing; ZHOU, Xiangdong. Does tocilizumab have a magical therapeutic effect on COVID-19 patients without obvious adverse reactions?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 49, p. 30896-30897, 2020.
174. WANG, P. et al. Resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed mice via modulating the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 156, p. 83-98, 2020.
175. WANG, Z. et al. Resveratrol alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppressing HIF-1 α and NF- κ B expression. *Aging (Albany NY)*, v. 13, n. 3, p. 4605, 2021.
176. WANG, Wen et al. Extensive genetic diversity and host range of rodent-borne coronaviruses. *Virus Evolution*, v. 6, n. 2, p. veaa078, 2020.
177. WANG, Zhenyu; ZHENG, Jun. SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat. *International Journal of Biological Sciences*, v. 16, n. 10, p. 1678, 2020.
178. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 (11 de março de 2020). Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 01 dez. 2024.
179. WHO. Coronavirus Disease (COVID-19) (9 de agosto de 2023). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-%28covid-19%29>. Acesso em: 19 out. 2024.
180. WHO COVID-19 dashboard (2024). Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>. Acesso em: 01 de dezembro de 2024.
181. WIERSINGA, W. Joost et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*, v. 324, n. 8, p. 782-793, 2020.
182. WITKOWSKI, M. et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature*, v. 600, n. 7888, p. 295-301, 2021.
183. YUAN, Y. et al. The development of COVID-19 treatment. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1125246, 2023.
184. YUE, Rong-zheng et al. Atorvastatin reduces contrast media-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cells by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. **BMC nephrology**, v. 24, n. 1, p. 25, 2023.

185. ZHANG, Jiancheng; XIE, Bing; HASHIMOTO, Kenji. Current status of potential therapeutic candidates for the COVID-19 crisis. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 87, p. 59-73, 2020.
186. ZHANG, Xiao-Jing et al. In-hospital use of statins is associated with a reduced risk of mortality among individuals with COVID-19. *Cell metabolism*, v. 32, n. 2, p. 176-187. e4, 2020.
187. ZHAO, Yingchi et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4. *Cell Research*, v. 31, n. 7, p. 818-820, 2021.
188. ZHENG, Jun. SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat. *International Journal of Biological Sciences*, v. 16, n. 10, p. 1678, 2020.
189. ZHU, Zhoujie et al. Therapy targets SARS-CoV-2 infection-induced cell death. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 870216, 2022.

8. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Implementação e caracterização de modelo experimental de COVID-19 em camundongos transgênicos K18-hACE2", protocolo do CEUA: 191/2021 sob a responsabilidade de Vivian Vasconcelos Costa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 13/09/2021.

Vigência da Autorização	13/09/2021 a 12/09/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6

Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente

Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	12
Idade	6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério de Imunofarmacologia ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	36
Idade	6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / K18-hACE2
Nº de animais	54
Idade	6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Imunofarmacologia ICB/UFMG

Considerações posteriores:

13/09/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 13/09/2021. Validade: 13/09/2021 à 12/09/2026.
------------	---

Belo Horizonte, 10/02/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios de estatinas e resveratrol como alternativas terapêuticas durante infecção por coronavírus. Correlação destes efeitos com comorbidades", protocolo do CEUA: 32/2021 sob a responsabilidade de Frederico Marianetti Soriani que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/04/2021.

Vigência da Autorização	26/04/2021 a 25/04/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	55
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	33
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	66
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	132
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	132
Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	99

Peso/Idade	25g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

26/04/2021	Aprovado na reunião extraordinária emergencial on-line do dia 26/04/2021. Validade: 26/04/2021 à 25/04/2026
------------	---

Belo Horizonte, 01/07/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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