

PROGRAMA DE VOLUNTARIADO ACADÊMICO

TRADUÇÃO LIVRE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS SOBRE O COVID-19

Este projeto visa realizar a tradução livre de artigos científicos relacionados ao COVID-19, publicados em revistas internacionais de renome, com o objetivo de fornecer material traduzido e facilitar a compreensão e acesso à informação relevante aos profissionais de saúde de diversas áreas e a população em geral. Não há conflitos de interesse.

Título original: Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro

Autores: Wang, M., Cao, R., Zhang, L. *et al.*

Publicado em: Nature. Published online: 4 February 2020

DOI: 10.1038/s41422-020-0282-0

Carta ao Editor

Remdesivir e cloroquina inibem efetivamente in vitro o recém-surgido coronavírus (2019-nCoV)

Caro Editor:

Em dezembro de 2019, uma nova pneumonia causada por um patógeno previamente desconhecido emergiu em Wuhan, uma cidade com 11 milhões de habitantes no centro da China. Os casos iniciais foram relacionados a exposições em um mercado de frutos do mar em Wuhan. Em 27 de Janeiro de 2020, as autoridades Chinesas relataram 2835 casos confirmados na China continental, incluindo 81 mortes. Adicionalmente, 19 casos confirmados foram identificados em Hong Kong, Macau e Taiwan, e 39 casos importados foram identificados na Tailândia, Japão, Coreia do Sul, Estados Unidos, Vietnã, Singapura, Nepal, França, Austrália e Canadá. O patógeno logo foi identificado como o novo coronavírus (2019-nCoV), que está intimamente associado ao coronavírus relacionado à síndrome

respiratória aguda grave CoV (SARS-CoV). Atualmente, não há tratamento específico contra o novo vírus. Portanto, a identificação de agentes antivirais efetivos para combater a doença é necessária com urgência.

Uma abordagem eficiente para a descoberta de medicamentos é testar se os medicamentos antivirais existentes são efetivos no tratamento das infecções virais relacionadas. O 2019-nCoV pertence ao gênero Betacoronavirus, que também contém o SARS-CoV e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Diversos medicamentos, como ribavirina, interferon, lopinavir-ritonavir, corticoesteroides, têm sido utilizados em pacientes com SARS ou MERS, apesar de que a eficácia de alguns medicamentos permanece controversa. Nesse estudo, avaliamos a efetividade antiviral de cinco medicamentos aprovados pelo FDA, incluindo ribavirina, penciclovir, nitazoxanida, nafamostat, cloroquina e dois conhecidos medicamentos antivirais de amplo espectro, remdesivir (GS5734) e faviparavir (T-705), contra um isolado de uma amostra clínica de 2019-nCoV in vitro.

Foram realizados ensaios padronizados para a determinação dos efeitos desses componentes na

citotoxicidade, taxa de produção de novas partículas virais e taxas de infecção do 2019-nCoV. Primeiramente, a citotoxicidade dos componentes do candidato em células Vero E6 (ATCC-1586) foi determinada pelo ensaio CCK8. Então, células Vero E6 foram infectadas com nCoV-2019BetaCoV/Wuhan/WIV04/20192 com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.05 na presença de diferentes concentrações das drogas testadas. Nos controles, foi utilizado DMSO (Dimetilsulfóxido). As eficácias foram avaliadas pela quantificação do número de cópias virais no sobrenadante celular através de PCR em tempo real (qRT-PCR) e confirmada com a visualização da expressão da nucleoproteína (NP) viral através de microscopia com imunofluorescência 48h pós-infecção (p.i.) (o efeito citopático não era óbvio nesse ponto da infecção). Dentre as sete drogas testadas, altas concentrações de três análogos de nucleosídeos, incluindo ribavirina ($EC_{50}=109.50\mu\text{M}$, $CC_{50}>400\mu\text{M}$, índice de seletividade (SI) >3.65), penciclovir ($EC_{50}=95.96\mu\text{M}$, $CC_{50}>400\mu\text{M}$, $SI>4.17$) e favipiravir ($EC_{50}=61.88\mu\text{M}$, $CC_{50}>400\mu\text{M}$, $SI>6.46$) foram necessárias para reduzir a infecção viral (Fig. 1a e Informações Suplementares, Fig. S1). Por mais que o favipiravir demonstrou 100% de eficácia na proteção de ratos contra o vírus Ebola, mesmo que seu valor EC_{50} nas células Vero E6 ter sido tão alto quanto $67\mu\text{M}$, recomenda-se a realização de estudos in vivo adicionais para avaliar esse nucleosídeo antiviral. Um potente inibidor do MERS-CoV, Nafamostat, que impede a fusão de membranas, inibiu a infecção por 2019-nCoV ($EC_{50}=22.50\mu\text{M}$, $CC_{50}>100\mu\text{M}$, $SI>4.44$). Nitazoxanida, um agente antiprotozoário com potencial antiviral contra uma ampla variedade de vírus, incluindo coronavírus de animais e humanos, inibiu o 2019-nCoV em uma concentração micromolar baixa ($EC_{50}=2.12\mu\text{M}$;

$CC_{50}>35.53\mu\text{M}$; $SI>16.76$). Recomenda-se avaliação adicional in vivo dessa droga contra a infecção por 2019-nCoV. Notoriamente, dois compostos, remdesivir ($EC_{50}=0.77\mu\text{M}$; $CC_{50}>100\mu\text{M}$; $SI>129.87$) e cloroquina ($EC_{50}=1.13\mu\text{M}$; $CC_{50}>100\mu\text{M}$, $SI>88.50$) potencialmente bloquearam a infecção viral em uma concentração micromolar baixa, e demonstraram alto índice de seletividade (Fig. 1a, b).

Remdesivir foi reconhecido recentemente como uma droga antiviral promissora contra a grande variedade de infecções por vírus de RNA (incluindo o SARS/MERS-CoV) em cultura de células, modelos de ratos e de primata não humanos (PNH). Atualmente está sendo testado clinicamente para o tratamento de infecção pelo vírus Ebola. Remdesivir é um análogo de adenosina, que se incorpora a cadeia de RNA viral nascente e resulta em uma terminação prematura. Nosso ensaio de tempo de adição mostrou que o Remdesivir funciona em um estágio pós entrada do vírus (Fig 1c, d), o que está de acordo com seu mecanismo antiviral como análogo de nucleotídeo. Warren et al. Mostrou que nos modelos PNH, a administração intravenosa de 10mg/kg de Remdesivir resulta em níveis persistentes concomitantes de sua forma ativa no sangue ($10\mu\text{M}$) e confere proteção de 100% contra a infecção do vírus Ebola. Nossos dados mostraram que o valor de EC_{90} de Remdesivir contra o 2019-nCoV em células VeroE6 foi $1,76\mu\text{M}$, sugerindo que sua concentração de ação provavelmente será alcançada em PNH. Nossos dados preliminares (Informação Suplementar, Fig. S2) mostraram que Remdesivir também inibe infecção viral de forma eficiente em uma linhagem de célula humana (células hepáticas humanas cancerígenas Huh-7), que são sensíveis para o 2019-nCoV.

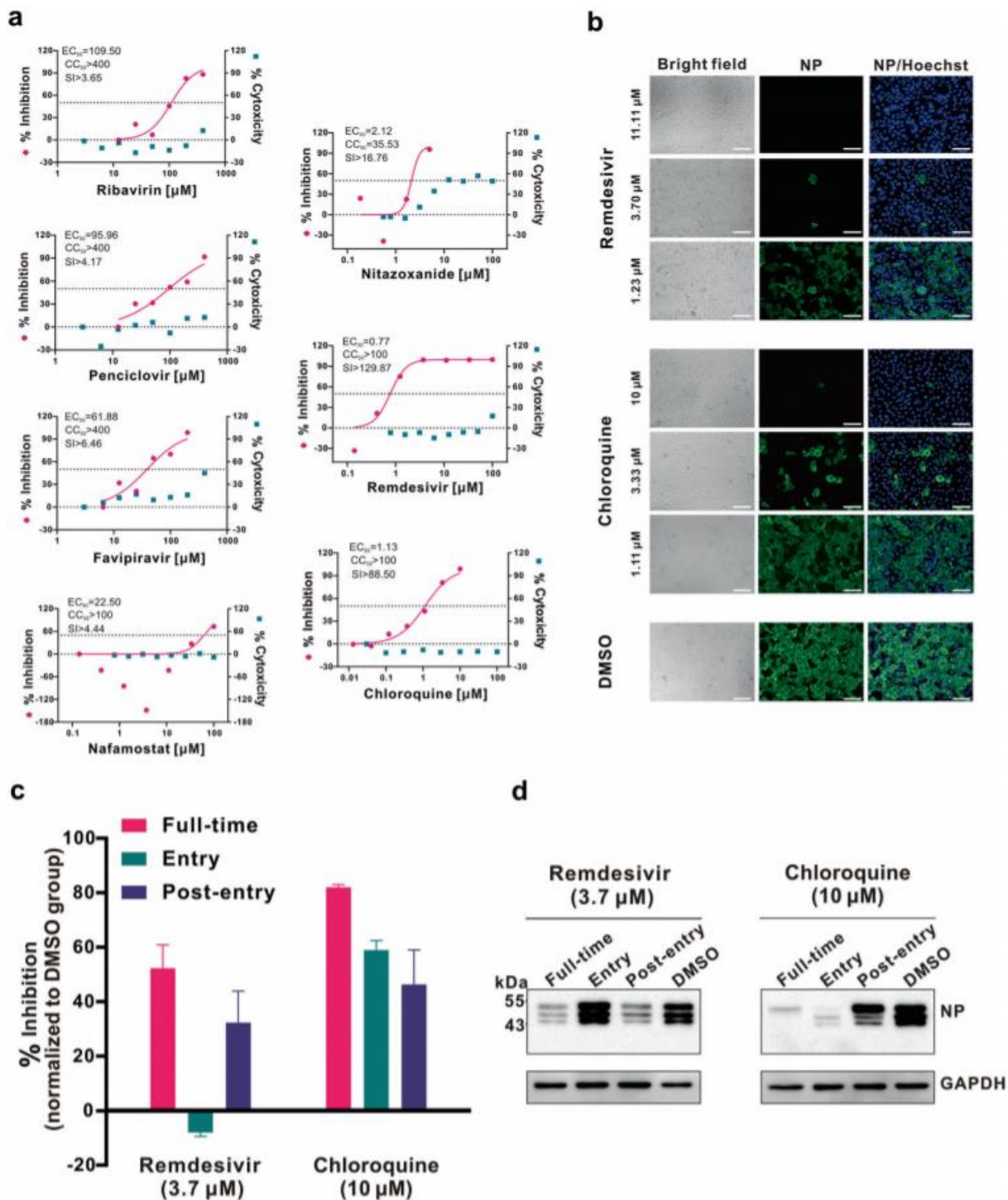


Fig. 1 As atividades antivirais das drogas testadas contra 2019-nCoV *in vitro*. **a.** Células Vero E6 foram infectadas com 2019-nCoV com uma MOI de 0.05 no tratamento de diferentes doses dos antivirais indicados por 48h. A produção de novas partículas virais no sobrenadante celular foi quantificada por qRT-PCR. Mensurou-se a citotoxicidade desses medicamentos contra as células Vero E6 através de ensaios CCK-8. Os eixos Y à esquerda e à direita dos gráficos representam a porcentagem média de inibição da produção de novas partículas virais e citotoxicidade das drogas, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicadas. **b.** Microscopia com imunofluorescência da infecção viral após tratamento com remdesivir e cloroquina. A infecção viral e o tratamento medicamentoso foram realizados conforme mencionado acima. Às 48h p.i., as células foram fixadas e então sondadas com soro de coelho contra as NP de um SARS-CoV SARS de morcego, como anticorpo primário, e um IgG anti-coelho da marca Alexa 488 (1:500;Abcam) como o anticorpo secundário, respectivamente. Os núcleos foram

marcados com corante Hoechst. Barras, 100 μm . **c e d.** Experimento de tempo de adição (time-of-addition) dos medicamentos remdesivir e cloroquina. Para tratamento “em tempo integral”, as células Vero E6 foram pré-tratadas com os medicamentos por 1h, então o vírus foi adicionado para permitir a afixação por 2h. Depois disso, a mistura de vírus com o medicamento foi removida, e as células foram cultivadas no meio contendo o medicamento até o final do experimento. Para o tratamento “de entrada”, as drogas foram adicionadas às células durante 1h antes da afixação viral e, às 2h p.i., a mistura de medicamento com vírus foi substituída por um meio de cultura fresco, e mantido até o final do experimento. Para o experimento “pós-entrada”, as drogas foram adicionadas às 2h p.i., e mantidas até o final do experimento. As células de todos os grupos do experimento foram infectadas com 2019-nCoV com uma MOI de 0.05, e a produção de novas partículas virais no sobrenadante das células infectadas foi quantificada por qRT-PCR. A expressão de NP nas células infectadas foi analisada através de Western blot. **d.** às 14h p.i.

Cloroquina, um anti-malárico e medicamento para doença autoimune amplamente utilizado, foi recentemente relatado como um potencial medicamento antiviral de amplo espectro. Cloroquina é conhecida por bloquear a infecção viral aumentando o pH endossomal necessário para a fusão viral/celular, assim como interfere com a glicosilação de receptores celulares do SARS-CoV. Nosso ensaio de tempo de adição demonstrou que a cloroquina funciona em ambos os estágios de entrada e pós-entrada da infecção pelo 2019-nCoV em células VeroE6 (Fig. 1c,d). Além da sua atividade antiviral, a cloroquina tem uma atividade imunomoduladora que pode sinergicamente melhorar seu efeito antiviral in vivo. A cloroquina é amplamente distribuída no corpo todo, incluindo pulmões, após sua administração oral. O valor EC_{90} de cloroquina contra o 2019-nCoV em células VeroE6 foi 6,90 μM , que pode ser clinicamente possível como demonstrado no plasma de pacientes com artrite reumatoide que receberam uma administração de 500mg. Cloroquina é uma droga segura e barata que tem sido usada por mais de 70 anos e, portanto, é potencialmente aplicável clinicamente contra o 2019-nCoV.

Nossos achados revelaram que remdesivir e cloroquina são altamente efetivos no controle da infecção do 2019-nCoV in vitro. Visto que esses compostos foram usados em pacientes humanos com um histórico seguro e mostraram ser efetivos contra várias doenças, nós sugerimos que eles sejam avaliados em pacientes humanos que sofrem da doença do novo coronavírus.

Agradecimentos

Nós agradecemos a Xi Wang, Yan Wu, Weijuan Shang, Huanyu Zhang, Yufeng Li, Hengrui Hu, Xiaming Jiang, Yuan Sun, do Instituto de Virologia de Wuhan por sua assistência essencial nesse estudo. Nós agradecemos ao Prof. Fei Deng do Centro Nacional de Pesquisa Viral, e Tao Du, Jia Wu e Hao Tang do Laboratório BSL-3 do Instituto de Virologia de Wuhan pelo seu apoio crítico. Nós agradecemos ao Prof. Yanyi Wang e outros colegas do Instituto de Virologia de Wuhan e Laboratório de Biossegurança Nacional de Wuhan por sua excelente coordenação. Nós agradecemos ao Dr. Basil Arif pela edição científica desse manuscrito. Nós agradecemos aos revisores anônimos pelas suas valiosas sugestões. Este trabalho foi apoiado em parte por doações dos Principais Projetos Nacionais de Ciência e Tecnologia para "Inovação e Desenvolvimento de Novas Drogas Principais" (dirigido pelo Prof. Song Li) (2018ZX09711003), Fundação Nacional de Ciências Naturais da China (31621061) e o Projeto de Pesquisa Científica de Emergência para 2019-nCoV da Província de Hubei (para os Profs. Zhengli Shi e Gengfu Xiao).

Contribuições dos autores

G.X., W.Z., Z.H., M.W., R.C. e L.Z. concebeu e desenhou os experimentos. X.Y., J.L., M.X., M.W., R.C. e L.Z. participou de vários experimentos; G.X., W.Z., Z.H., Z.S., M.W., R.C. e L.Z. analisou os dados. M.W., L.Z., R.C. e Z.H. escreveu o manuscrito. G.X., W.Z. e Z.H. forneceu a aprovação final do manuscrito.

Informação adicional

Informações adicionais acompanham este artigo em <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Huang, C. L. et al. The Lancet [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5) (2020).
2. Zhou, P. et al. Nature (accepted).
3. Zumla, A., Chan, J. F., Azhar, E. I., Hui, D. S. & Yuen, K. Y. Nat. Rev. Drug Discov. 15, 327–347 (2016).
4. Oestereich, L. et al. Antivir. Res. 105, 17–21 (2014).
5. Sheahan, T. P. et al. Sci. Transl. Med. 9, eaal3653 (2017).
6. Mulangu, S. et al. N. Engl. J. Med. 381, 2293–2303 (2019).
7. Warren, T. K. et al. Nature 531, 381–385 (2016).
8. Savarino, A., Di Trani, L., Donatelli, I., Cauda, R. & Cassone, A. Lancet Infect. Dis. 6, 67–69 (2006).
9. Yan, Y. et al. Cell Res. 23, 300–302 (2013).
10. Vincent, M. J. et al. Virol. J. 2, 69 (2005).
11. Mackenzie, A. H. Am. J. Med. 75, 40–45 (1983).

Traduzido por¹: Anna Luiza Maffessoni e Manoela Ferreira da Cruz Neta

Revisado por¹: Natalie Toki Komori e Victoria Castello Branco I. de Mattos

Supervisão²: Dr. Rafael Lirio Bortoncello

1. Acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Toledo.
2. Médico radiologista e professor do curso de Medicina da UFPR, campus Toledo.