



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JOÃO VICTOR SOBREIRA XAVIER

**INFLUÊNCIA DO SEXO NA TOXICIDADE DE LMED-136 E
RTB-182:
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E OXIDATIVA EM
CAMUNDONGOS SWISS**

JOÃO VICTOR SOBREIRA XAVIER

**INFLUÊNCIA DO SEXO NA TOXICIDADE DE LMED-136 E
RTB-182:
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E OXIDATIVA EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Londrina
2025

JOÃO VICTOR SOBREIRA XAVIER

**INFLUÊNCIA DO SEXO NA TOXICIDADE DE LMED-136 E
RTB-182:
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E OXIDATIVA EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Frederico
Rodrigues Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Fernando Henrique Borges
Universidade do Porto – U. Porto

Prof^a. Dr^a Juliana Rubira Gerez
Pontifícia Universidade Católica do Paraná –
PUCPR

Londrina, 28 de novembro de 2025.

À minha família, que me ensinou que o conhecimento floresce onde há amor, paciência e fé.

Mais uma vez, por nós — e por quem segue vivo na saudade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, pela compreensão diante dos desafios e pela constante motivação que sustentou esta trajetória. O exemplo de dedicação e perseverança de cada um foi essencial para que este trabalho se concretizasse. Em especial, dedico meu carinho e gratidão ao meu avô (*in memoriam*), à minha avó e à minha mãe.

Registro minha gratidão aos amigos e colegas que, de diferentes maneiras, contribuíram com palavras de incentivo, companheirismo e valiosas trocas de conhecimento, em especial aos colegas de pós-graduação vinculados ao Laboratório de Patologia Animal e ao Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, da Universidade Estadual de Londrina, instituição que me acolheu e pela qual nutro profundo respeito e apreço.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, expresso meu profundo reconhecimento pela orientação criteriosa, pela paciência e pelo incentivo constante. Sua competência científica e sensibilidade como educadora foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho e para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos pesquisadores e integrantes desta pesquisa, agradeço pela troca de experiências, pelas valiosas contribuições e pelo ambiente de aprendizado coletivo, que enriqueceram o processo de investigação.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, pelas contribuições construtivas e pelas valiosas observações que aprimoraram este trabalho. Estendo meus sinceros agradecimentos a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo.

Este trabalho contou com o generoso apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo nº 88887.834940/2023-00, cuja contribuição tornou possível a realização desta trajetória.

**“Não vou mudar, esse caso não tem
solução, sou fera ferida no corpo, na alma e
no coração.”**

— Maria Bethânia, Fera Ferida

XAVIER, João Victor Sobreira. **Influência do sexo na toxicidade de LMED-136 e RTB-182: análise histopatológica e oxidativa em camundongos Swiss**. 2025. 60 pp. Tese/Dissertação (Mestrado em 2025) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

A pandemia de COVID-19 reforçou a necessidade de identificar terapias antivirais seguras e eficazes. Este estudo investigou o perfil toxicológico e a resposta ao estresse oxidativo das substâncias antivirais experimentais LMed-136, molécula do grupo das benzoilguanidinas identificada como um potencial inibidor de protease principal (Mpro), e RTB-182, molécula derivada de cumarina e candidata a inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), administradas nas concentrações de 0,66 mg/mL e 0,545 mg/mL, respectivamente. O delineamento experimental compreendeu oito grupos (n = 8 por grupo), expostos às substâncias durante sete dias consecutivos. Após o período de tratamento, foram coletados fígado, rins, baço e jejuno para análises histopatológicas, com determinação de escores de lesão tecidual, marcadores de dano oxidativo por lipoperoxidação (TBARS/MDA) e parâmetros do potencial antioxidante, avaliados por meio da atividade da glutathione S-transferase (GST) e da capacidade antioxidante total (FRAP). Observou-se dimorfismo sexual acentuado nas respostas toxicológicas: os machos apresentaram maior suscetibilidade a lesões hepáticas e renal, com incremento significativo nos marcadores de estresse oxidativo, enquanto fêmeas exibiram resposta antioxidante mais robusta, associada a maior proteção tecidual. O padrão dimórfico foi especialmente evidente no fígado, possivelmente relacionado a diferenças hormonais e metabólicas. Nos demais órgãos, as alterações foram heterogêneas e sem relevância morfológica significativa. Entre os compostos avaliados, LMed-136 demonstrou menor hepatotoxicidade em comparação ao RTB-182. Conclui-se que a resposta biológica ao estresse oxidativo e à toxicidade induzida pelos compostos testados é substancialmente modulada pelo sexo, reforçando a importância da estratificação por sexo em investigações toxicológicas de moléculas antivirais experimentais.

Palavras-chave: Dimorfismo sexual; estresse oxidativo; hepatotoxicidade; compostos antivirais; modelos pré-clínicos.

XAVIER, João Victor Sobreira. **Influence of sex on the toxicity of LMED-136 and RTB-182: histopathological and oxidative analysis in Swiss mice.** 2025. 60 pp. Dissertation (Master's degree, 2025) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has reinforced the need to identify safe and effective antiviral therapies. This study investigated the toxicological profile and oxidative stress response of the experimental antiviral substances LMed-136, a molecule from the benzoylguanidine group identified as a potential main protease (Mpro) inhibitor, and RTB-182, a coumarin-derived molecule and candidate RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitor, administered at concentrations of 0.66 mg/mL and 0.545 mg/mL, respectively. The experimental design comprised eight groups (n = 8 per group), exposed to the substances for seven consecutive days. After the treatment period, liver, kidneys, spleen, and jejunum were collected for histopathological analysis, with determination of tissue lesion scores, markers of oxidative damage by lipoperoxidation (TBARS/MDA), and antioxidant potential parameters, evaluated by glutathione S-transferase (GST) activity and total antioxidant capacity (FRAP). Marked sexual dimorphism was observed in the toxicological responses: males showed greater susceptibility to liver and kidney damage, with a significant increase in oxidative stress markers, while females exhibited a more robust antioxidant response, associated with greater tissue protection. The dimorphic pattern was especially evident in the liver, possibly related to hormonal and metabolic differences. In the other organs, the changes were heterogeneous and without significant morphological relevance. Among the compounds evaluated, LMed-136 showed lower hepatotoxicity compared to RTB-182. It is concluded that the biological response to oxidative stress and toxicity induced by the tested compounds is substantially modulated by sex, reinforcing the importance of sex stratification in toxicological investigations of experimental antiviral molecules.

Key-words: Sexual dimorphism; oxidative stress; hepatotoxicity; antiviral compounds; preclinical models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma experimental do estudo de toxicidade intranasal dos compostos LMed-136 e RTB-182 em camundongos machos e fêmeas.	34
Figura 2 – Avaliação do escore lesional do fígado de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. U.A.= Unidades arbitrárias.....	37
Figura 3 – Fotomicrografia de fígado de camundongo Swiss fêmeas exposto por via intranasal ao composto com solução salina. Observa-se vacuolização citoplasmática de hepatócitos (setas). HE. Barra de escala 10 µm.	38
Figura 4 – Fotomicrografia de fígado de camundongo Swiss macho exposto por via intranasal ao composto RTB-182. Observa-se necrose focal de hepatócitos (seta vazada) e megalocitose (seta preta). HE. Barra de escala 10 µm.	39
Figura 5 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no fígado de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).....	40
Figura 6 – Jejuno de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do jejuno de camundongo macho do grupo RTB-182. Observa-se discreto edema de lâmina própria. HE. Barra de escala 200 µm. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas. U.A.= Unidades arbitrárias.	43
Figura 7 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no jejuno de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).....	45
Figura 8 – Rim de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do rim de camundongo macho do grupo RTB-182. Observa-se congestão vascular (seta preta) e necrose tubular focal (seta vazada). HE. Barra de escala 10 µm. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas. U.A.= Unidades arbitrárias.	46
Figura 9 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no rim de camundongos Swiss	

machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).....49

Figura 10 – Baço de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea do composto LMed-136. Observa-se hiperplasia linfóide evidenciada pelo aumento dos folículos linfáticos na polpa branca (seta preta). HE. Barra de escala 100 µm. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas U.A.= Unidades arbitrárias.....51

Figura 11– Análise da resposta ao estresse oxidativo no baço de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais, sexo e tratamento aplicado.	33
Tabela 2 – Critérios do escore lesional para análise histopatológica.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARTE	Terapia Antirretroviral
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
CYP	Citocromo
CYP450	Citocromo P450
DILI	<i>Drug-induced liver injury</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMH	Hematopoiese Extramedular
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
FC-	Fêmeas - Controle Negativo
FC+	Fêmeas - Controle Positivo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRAP	Capacidade Redutora Férrica do Plasma
GSH	Glutathiona Reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
HE	Hematoxilina e eosina

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- β	Interferon Beta
MC-	Machos - Controle Negativo
MC+	Machos - Controle Positivo
MDA	Malondialdeído
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
Mpro	Protease principal
NHC	N4-hidroxicitidina
NHE	Nicho Hematopoiético Extramedular
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RSI	Regulamento Sanitário Internacional
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNIPAMPA	Universidade Federal do Pampa
hACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2 Humana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA/ rEFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Pandemia: covid-19 e o sars-cov-2.....	16
2.2	Estratégias Terapêuticas Antivirais Integradas às Abordagens de Desenvolvimento de Fármacos para o SARS-CoV-2	18
2.3	Modelos experimentais no estudo da covid-19	20
2.4	Estresse oxidativo e toxicidade em terapias antivirais	21
3	REFERÊNCIAS	23
4	HIPÓTESE	27
5	OBJETIVOS	28
5.1	Objetivo Geral	28
5.2	Objetivos Específicos.....	28
	Toxicidade sexo-dependente dos compostos LMED-136 e RTB-182 administradAs por via intranasal em camundongos Swiss	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7	Referências	56

1 INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, representou um dos maiores desafios sanitários globais das últimas décadas, revelando a complexidade das doenças virais emergentes e a necessidade contínua de desenvolvimento de antivirais eficazes e seguros. Entre os alvos moleculares mais promissores destaca-se a protease principal viral (Mpro), essencial para o processamento das poliproteínas e, portanto, para a replicação viral, e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), componente central da maquinaria replicativa do vírus. A Mpro possui um sítio catalítico altamente conservado entre variantes, o que a torna um alvo farmacológico estratégico para o desenvolvimento de antivirais de amplo espectro, sendo amplamente explorada como alvo terapêutico. Por outro lado, a RdRp é evidenciada por estudos que demonstram que antivirais deste grupo, como Remdesivir, atuam diretamente sobre a interrupção da síntese do RNA viral, reduzindo a replicação do SARS-CoV-2 (Li *et al.*, 2023; Mengist *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2020).

Nesse contexto, um grupo de pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina conduziu previamente estudos *in silico* e ensaios celulares que demonstraram que os compostos experimentais LMed-136, uma molécula do grupo das benzoilguanidinas identificada como um potencial inibidor de protease principal (Mpro), e RTB-182, uma molécula derivada de cumarina e candidata a inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), apresentam interação favorável com seus respectivos alvos moleculares, além de exibirem atividade antiviral *in vitro* contra o SARS-CoV-2 com baixa citotoxicidade em linhagens celulares (Santiago-Silva *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022). Esses resultados fornecem a base necessária para considerar essas moléculas como candidatas promissoras, mas não permitem inferir segurança sistêmica, efeitos tóxicos em órgãos-alvo ou possíveis limitações biológicas relevantes. A translação de achados *in vitro* para aplicações pré-clínicas exige obrigatoriamente avaliação toxicológica em modelos animais que permitam estimar risco, reatividade tecidual e potenciais lesões histopatológicas associadas à exposição repetida (Jiang *et al.*, 2023).

Apesar do crescente número de fármacos descritos em triagens computacionais e celulares, persiste uma questão inexplorada evidente: poucos desses compostos possuem caracterização toxicológica *in vivo* suficiente para apoiar

futuras etapas de desenvolvimento. A literatura mostra, inclusive, que antivirais atualmente utilizados no contexto da COVID-19 podem provocar alterações hepáticas e metabólicas relevantes, reforçando a necessidade de avaliações de segurança robustas antes de avançar para estágios pré-clínicos e clínicos (Casalini *et al.*, 2022). Assim, a caracterização dos efeitos de LMed-136 e RTB-182 sobre fígado, rim, baço e jejuno torna-se um passo essencial para determinar sua viabilidade como candidatos farmacológicos.

É importante ressaltar que o objetivo deste estudo não é investigar eficácia antiviral *in vivo*, mas sim delinear o perfil toxicológico sistêmico dos compostos. Para isso, empregou-se o camundongo Swiss não transgênico, um modelo amplamente estabelecido em estudos toxicológicos devido à sua variabilidade genética, robustez e capacidade de revelar lesões em múltiplos tecidos-alvo. Ao contrário de modelos transgênicos expressando hACE2 ou de espécies suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, o camundongo Swiss não é adequado para avaliar replicação viral ou resposta infecciosa, mas é reconhecido como modelo sensível à detecção de efeitos tóxicos sistêmicos, sendo apropriado para o objetivo deste trabalho (Rodrigues *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2020)

Outro aspecto fundamental refere-se ao dimorfismo sexual, um determinante amplamente reconhecido na toxicologia experimental e capaz de modular respostas fisiológicas e metabólicas a xenobióticos. Machos e fêmeas diferem quanto ao metabolismo de xenobióticos, composição corporal, atividade das isoenzimas do citocromo P450 e regulação hormonal, fatores que podem modificar tanto a intensidade quanto o tipo de lesões tóxicas observadas (Allegra *et al.*, 2023). Considerando essas diferenças biológicas, a análise separada por sexo não apenas fortalece a validade do estudo como também antecipa elementos críticos para a interpretação dos achados. Assim, incluir o sexo como variável foi fundamental para identificar potenciais diferenças nas respostas histopatológicas e nos marcadores de estresse oxidativo.

Dessa forma, este estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre a segurança pré-clínica de moléculas antivirais candidatas, fornecendo dados essenciais para decisões regulatórias e de desenvolvimento farmacológico ao avaliar a toxicidade histopatológica e os marcadores de estresse oxidativo induzidos pelos compostos LMed-136 e RTB-182 em órgãos-alvo de camundongos Swiss machos e fêmeas submetidos à administração intranasal.

2 REVISÃO DE LITERATURA/ REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANDEMIA: COVID-19 E O SARS-COV-2

Durante o mês de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada acerca de casos de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, província de Hubei, China. Subsequentemente, essa condição clínica foi caracterizada como COVID-19. Em janeiro de 2020, a OMS declarou a situação como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), conforme os termos do Regulamento Sanitário Internacional (RSI), objetivando a implementação de respostas coordenadas e estratégias imediatas destinadas à prevenção da disseminação global da doença. Entretanto, em março de 2020, a COVID-19 foi classificada pela OMS como uma pandemia global, configurando-se como ameaça significativa à saúde pública internacional e resultando em impactos epidemiológicos, sociais e econômicos de magnitude consideráveis (Gusev *et al.*, 2022; Jackson *et al.*, 2022; OPAS, 2020).

Em 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o encerramento da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional relativa à COVID-19, ressaltando que a medida não significava a eliminação do SARS-CoV-2, mas a transição para um modelo de manejo sustentado e de longo prazo da doença (WHO, 2023). No Brasil, esse processo havia sido antecipado pela revogação da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), formalizada pela Portaria GM/MS nº 913, de 22 de abril de 2022 (BRASIL, 2022).

Apesar do término das fases emergenciais, evidências epidemiológicas recentes demonstram que o SARS-CoV-2 permanece em circulação global significativa. Relatório da OMS de maio de 2025 apontou que a taxa de positividade em sistemas de vigilância sentinela atingiu 11%, caracterizando uma intensificação da atividade viral e a manutenção de um cenário de preocupação sanitária internacional (WHO, 2025).

Mesmo no período pós-emergencial, a transmissão comunitária do SARS-CoV-2 persiste em padrão endêmico, caracterizado por oscilações sazonais e episódios pontuais de recrudescimento. No Brasil, boletins da Fiocruz publicados em setembro de 2025 indicaram que aproximadamente 15,5% dos casos positivos de

síndrome respiratória aguda grave (SRAG) daquele período foram decorrentes da infecção por SARS-CoV-2, evidenciando a continuidade da circulação viral e a relevância da vigilância epidemiológica integrada (FIOCRUZ, 2025).

A COVID-19 é causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), um betacoronavírus previamente desconhecido da família *Coronaviridae*. Os coronavírus são vírus de RNA fita simples de sentido positivo, envelopados, que infectam uma ampla gama de espécies, incluindo animais e humanos (Hu *et al.*, 2021). Décadas antes, duas espécies de coronavírus zoonóticos já haviam sido identificadas como altamente patogênicas: o SARS-CoV e o MERS-CoV, responsáveis por epidemias de síndrome respiratória aguda grave em Guangdong, China, em 2002, e no Oriente Médio, em 2012, respectivamente. Até esses episódios, acreditava-se que os coronavírus infectavam predominantemente animais, mas, com o surgimento dessas epidemias, as coronaviroses passaram a representar uma preocupação significativa para a saúde pública global (Hu *et al.*, 2021; Shereen *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 compartilha a organização genômica com outros betacoronavírus e apresenta uma elevada capacidade de mutação, possibilitando a recombinação e o surgimento de novas cepas (Jin *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Sua estrutura genômica inclui seis quadros de leitura aberta funcionais (ORFs), além da codificação de proteínas estruturais spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). Análises filogenéticas indicam que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado com coronavírus encontrados em morcegos e pangolins, sugerindo que esses animais atuam como reservatórios naturais e possíveis hospedeiros intermediários. Esses achados fornecem informações cruciais sobre a origem zoonótica e as vias de transmissão do vírus (Hu *et al.*, 2021).

A replicação do SARS-CoV-2 inicia-se nas células epiteliais do trato respiratório superior, com subsequente disseminação para o trato respiratório inferior e, eventualmente, para o sistema gastrointestinal (Jin *et al.*, 2020). A infecção por COVID-19 pode apresentar uma ampla gama de manifestações clínicas, variando de quadros assintomáticos a condições graves, potencialmente fatais. Durante a fase aguda da infecção, os sintomas respiratórios são predominantes e, em casos severos, podem progredir para insuficiência respiratória e óbito. Adicionalmente, a COVID-19 pode provocar comprometimento sistêmico, afetando outros órgãos e sistemas além do respiratório, como o sistema cardiovascular, renal, neurológico e gastrointestinal,

evidenciando o caráter multissistêmico da doença (Choudhary *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2020).

2.2 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS ANTIVIRAIS INTEGRADAS ÀS ABORDAGENS DE DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS PARA O SARS-CoV-2

A pandemia de COVID-19 impôs desafios sanitários sem precedentes e impulsionou, em escala global, esforços voltados à busca por terapias antivirais eficazes. Apesar do incentivo à identificação de compostos capazes de interferir nos mecanismos de replicação viral, observou-se relutância na consolidação de avaliações equilibradas entre benefícios terapêuticos e riscos associados ao desenvolvimento de novos fármacos — hesitação frequentemente relacionada à adequação de modelos experimentais e às exigências regulatórias das agências sanitárias (Pepe *et al.*, 2021). Nesse cenário de urgência, o reposicionamento farmacológico emergiu como estratégia rápida e segura, destacando-se inicialmente pequenas moléculas e agentes biológicos (Ferreira; Andricopulo, 2020).

Diversos compostos foram investigados no início da pandemia, incluindo a ribavirina — que apresentou efeito sinérgico com IFN- β na inibição da replicação do SARS-CoV em estudos *in vitro* (Gomes *et al.*, 2022) — e o remdesivir, identificado como inibidor promissor da RNA polimerase dependente de RNA viral (Ferner; Aronson, 2020). Em contraste, os inibidores de proteases ritonavir e lopinavir, previamente empregados no tratamento de SARS-CoV em 2004 e MERS-CoV em 2015, não demonstraram eficácia contra o SARS-CoV-2 (Ferreira; Andricopulo, 2020).

Atualmente, conforme regulamentação da ANVISA (2025), encontram-se aprovados antivirais como Paxlovid (nirmatrelvir/ritonavir), Remdesivir e Molnupiravir, além de imunomoduladores como Tocilizumabe e Baricitinibe, indicados sobretudo para casos moderados a graves. Tais medicamentos atuam de maneira complementar: enquanto antivirais limitam a replicação viral, imunomoduladores reduzem a resposta inflamatória exacerbada associada à COVID-19. Por outro lado, fármacos como hidroxiclороquina e ivermectina foram descartados por ausência de evidência científica robusta; já anticorpos monoclonais como bamlanivimabe/etesevimabe, casirivimabe/imdevimabe, sotrovimabe e bebtelovimabe tiveram aprovação revogada pela FDA devido à ineficácia frente à variante Ômicron,

então dominante no país (Merck Sharp & Dohme Corp., 2025).

Paralelamente aos esforços de reposicionamento, o desenvolvimento de novos antivirais foram substancialmente acelerados pelo avanço das metodologias computacionais. Abordagens *in silico*, especialmente as baseadas em triagem virtual, tornaram-se fundamentais para a rápida identificação de moléculas bioativas em contextos emergenciais. Essas metodologias permitem estimar similaridades estruturais, propriedades físico-químicas e potenciais efeitos toxicológicos, contribuindo para agilizar etapas preliminares, reduzir custos e direcionar estudos pré-clínicos de forma mais eficiente (Jonco, 2022; Maia *et al.*, 2020; Kontoyianni, 2017).

A protease principal do SARS-CoV-2 (Mpro) consolidou-se como alvo terapêutico prioritário, dada sua relevância na clivagem de poliproteínas virais e, conseqüentemente, na replicação do vírus (Jin *et al.*, 2020; Báez-Santos *et al.*, 2015). Nesse contexto, pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina identificaram, por meio de docking molecular e simulações de dinâmica molecular, quatro benzoilguanidinas da LaSMMed Chemical Library (LMCL), uma biblioteca interna de produtos químicos utilizada como espaço químico para triagem virtual, para identificar novos inibidores da Mpro, com predições favoráveis de absorção, distribuição, metabolização e excreção (Santiago-Silva *et al.*, 2022). Dentre esses compostos, destaca-se a LMed-136, selecionada no presente estudo devido ao seu potencial como inibidor da Mpro. A relevância farmacológica das benzoilguanidinas é ainda corroborada por evidências prévias que demonstram atividade antiviral contra diferentes vírus de RNA (Ghosh *et al.*, 2018; Hishiki *et al.*, 2017).

Outro estudo identificou uma molécula adicional, derivada de cumarina, denominada RTB-182, com capacidade de inativar o vírus *in vitro* e com baixa citotoxicidade, atuando principalmente como um inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), formando interações estáveis capazes de inibir a síntese do RNA viral e, conseqüentemente, a replicação do vírus, semelhante ao Remdesivir (Gomes *et al.*, 2022).

Além da caracterização estrutural e energética, a previsão de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos é crucial para o desenvolvimento racional de fármacos. As análises *in silico* demonstraram que as substâncias avaliadas não violam as regras de Lipinski (1997) e atendem aos critérios de permeabilidade de Veber *et al.* (2002), sugerindo propriedades compatíveis com administração oral. Esses compostos apresentaram potencial para inibir isoformas relevantes do citocromo

P450, conforme predições do ADME-Tox, sistema de análise responsável pelos cálculos computacionais para estimar as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, relacionando a similaridade com fármacos e à absorção oral (Gomes *et al.*, 2022; Santiago-Silva *et al.*, 2022).

Mesmo com avanços substanciais, as predições computacionais não substituem ensaios *in vitro* e *in vivo*, mas atuam de forma complementar, especialmente relevantes no contexto pandêmico que exigiu rapidez e racionalização de recursos (Jonco, 2022; Mattos, 2022)

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS NO ESTUDO DA COVID-19

Embora diversos inibidores tenham demonstrado eficácia *in vitro* contra o SARS-CoV-2, sua segurança e desempenho em estudos *in vivo* ainda não foram plenamente estabelecidos, reforçando a necessidade de continuidade dos ensaios pré-clínicos e clínicos (Jin *et al.*, 2020). Nesse contexto, o uso de modelos animais permanece fundamental não apenas para o desenvolvimento de novas terapias, mas também para o aprofundamento da compreensão dos mecanismos de patogênese associados à COVID-19.

Diversas espécies naturalmente suscetíveis ao SARS-CoV-2 têm sido utilizadas, como hamsters, furões, primatas não humanos e camundongos, sendo estes últimos amplamente empregados por sua acessibilidade, disponibilidade e extensa caracterização biológica. Contudo, camundongos de linhagens convencionais apresentam diferenças estruturais na enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) que inviabilizam a ligação da proteína viral spike e, portanto, a replicação eficiente do vírus. Para superar essa limitação, modelos geneticamente modificados foram desenvolvidos para expressar hACE2, permitindo a realização de estudos de infecção e resposta imune (Liu *et al.*, 2024; Clever; Volz, 2023; Jiang *et al.*, 2020).

De fato, a utilização de modelos transgênicos expressando hACE2 é essencial para reproduzir a infecção e investigar desfechos virológicos, imunológicos e de patogênese (Liu *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2020; Israelow *et al.*, 2020;). Entretanto, esses modelos apresentam maior complexidade operacional, custos elevados, necessidade de infraestrutura específica e geralmente manifestam fenótipo de doença grave, o que nem sempre é necessário para responder perguntas centradas em segurança. No presente estudo, o foco recaiu sobre a avaliação da

toxicidade local e sistêmica de formulações intranasais contendo moléculas com potencial antiviral, e não sobre a replicação viral propriamente dita. Assim, camundongos Swiss não transgênicos configuram um modelo apropriado para toxicologia regulatória, permitindo a investigação de efeitos agudos e subagudos sobre mucosa nasal, vias aéreas e órgãos sistêmicos, em conformidade com diretrizes para rotas menos usuais de administração (Emami *et al.*, 2018).

Ainda que a ausência de susceptibilidade viral limite a extrapolação sobre eficácia antiviral, esse modelo possibilita a avaliação de eventos adversos locais, potenciais efeitos sistêmicos e a inclusão do dimorfismo sexual como variável biológica relevante — aspecto fundamental em estudos toxicológicos contemporâneos (Islam *et al.*, 2021). Reconhecem-se, contudo, limitações inerentes ao delineamento, como a falta de dados farmacocinéticos e o risco de baixa absorção de compostos hidrofílicos pela via nasal, especialmente quando não se empregam estratégias de formulação destinadas a aumentar permeação e retenção na mucosa (Clementino *et al.*, 2021).

Assim, os resultados devem ser interpretados como etapa preliminar de segurança, necessária antes da transição para modelos suscetíveis ou para estudos clínicos, nos quais parâmetros de eficácia antiviral e distribuição sistêmica poderão ser avaliados com maior robustez (Clementino *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021; Emami *et al.*, 2018).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E TOXICIDADE EM TERAPIAS ANTIVIRAIS

O estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do organismo. É um dos principais mecanismos de toxicidade de medicamentos. Muitos medicamentos aumentam a formação de ERO, causando danos a biomoléculas importantes, como DNA, proteínas e lipídios. A produção de ERO pode ocorrer diretamente durante o metabolismo de certos medicamentos ou interferindo nos sistemas antioxidantes celulares. Estruturas como mitocôndrias e sistemas enzimáticos do citocromo P450 são fontes comuns de ERO durante processos metabólicos e ativação biológica de compostos tóxicos (Deavall *et al.*, 2012).

Esse sistema desempenha um papel importante na patogênese do COVID-19. A infecção viral desencadeia o aumento da produção de espécies reativas de

oxigênio, levando a danos oxidativos nas células hospedeiras. O coronavírus induz diretamente a produção de espécies reativas de ERO ao invadir as células hospedeiras, resultando em alterações nas vias metabólicas e, consequentemente, na amplificação do dano oxidativo, como a disfunção mitocondrial e a ativação de enzimas como a NADPH oxidase, o que exacerba o dano celular. Além disso, o coronavírus está associado à resposta imune antiviral inata do organismo, potencializando o ciclo de produção de oxidantes (Gain *et al.*, 2023).

O dimorfismo sexual modula a suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido por antivirais, com hormônios sexuais influenciando a atividade de enzimas antioxidantes. Fêmeas geralmente exibem maior defesa antioxidante quando comparada aos machos devido aos efeitos protetores do estrogênio (Kander; Liu, 2017). Essas diferenças sexo-dependentes reforçam a necessidade de considerar o sexo como variável biológica na avaliação toxicológica de antivirais, preparando a interpretação dos achados histopatológicos e bioquímicos observados neste estudo (Zervopoulou *et al.*, 2024).

3 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Medicamentos aprovados para tratamento da COVID-19. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/campanhas/coronavirus/medicamentos>. Acesso em: 15 set. 2025.

ALLEGRA, S. et al. Evaluation of Sex Differences in Preclinical Pharmacology Research: How Far Is Left to Go?. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 6, p. 786, 2023.

BÁEZ-SANTOS, Y. M.; ST. JOHN, S. E.; MESECAR, A. D. The SARS-CoV papain-like protease: structure, function, and inhibition. *Antiviral Research*, v. 115, p. 21–38, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus: Situação epidemiológica da COVID-19 no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 913, de 22 de abril de 2022. Declara o encerramento da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional. Brasília, 2022. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br>.

CASALINI, G., GIACOMELLI, A., & ANTINORI, S. Liver tests abnormalities with licensed antiviral drugs for COVID-19: a narrative review. *Expert opinion on drug safety*, 21(12), 1483–1494. 2022. <https://doi.org/10.1080/14740338.2022.2160446>

CHOUDHARY, S.; KANEVSKY, I.; TOMLINSON, L. Animal models for studying COVID-19, prevention, and therapy: pathology and disease phenotypes. *Veterinary Pathology*, v. 59, n. 4, p. 516–527, 2022.

CLEMENTINO, M. et al. Structure and fate of nanoparticles designed for the nasal delivery of poorly soluble drugs. *Molecular Pharmaceutics*, v. 18, n. 8, p. 3060–3074, 2021. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00366.

CLEVER, S.; VOLZ, A. Mouse models in COVID-19 research: analyzing the adaptive immune response. *Medical Microbiology and Immunology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2023.

DEAVALL, D. G.; MARTIN, E. A.; HORNER, J. M.; ROBERTS, R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012.

EMAMI, S. et al. Toxicology evaluation of drugs administered via uncommon routes: focus on intranasal delivery. *International Journal of Toxicology*, v. 37, n. 1, p. 4–16, 2018. DOI: 10.1177/1091581817741840.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Boletim InfoGripe: Rinovírus e SARS-CoV-2 causam aumento de casos de SRAG no Brasil. Rio de Janeiro, 2025. Disponível em: <https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202509/rinovirus-e-sars-cov-2-causam-aumento-de-casos-de-srag-no-brasil>.

FERNER, R. E.; ARONSON, J. K. Remdesivir in COVID-19. *BMJ*, p. m1610, 2020.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicamentos e tratamentos para a COVID-19. *Estudos Avançados*, v. 34, n. 100, p. 7–27, 2020.

GAIN, C.; BISWAS, P.; MUKHERJEE, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of infections with coronaviruses. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 2023.

GOMES, G. F. S.; COSTA, B. S.; MARQUES, R. E.; OLIVEIRA, A. C. S.; FREITAS, B. S. In silico approaches and in vitro assays identify a coumarin derivative as antiviral potential against SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1–14, 2022.

GORDON, C. J., TCHESNOKOV, E. P., WOOLNER, E., PERRY, J. K., FENG, J. Y., PORTER, D. P., & GÖTTE, M. Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *The Journal of biological chemistry*, 295(20), 6785–6797. 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013679>

GHOSH, A. K. et al. Design of potent HIV protease inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 61, p. 9722–9737, 2018.

GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V.; SEHGAL, K.; NAQVI, A.; MAHARAJ, S.; JIANG, Z.; FERROUSSI, M.; HOSSAIN, A. R.; BABIUK, L. A.; ELKAYAM, U.; et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nature Medicine*, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020. DOI: 10.1038/s41591-020-0968-3.

GUSEV, E.; ZAITSEVA, N.; VOLKOVA, A.; KOSTENKO, A.; EROKHOV, A. SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI, 2022.

HISHIKI T, KATO F, TAJIMA S, TOUME K, UMEZAKI M, TAKASAKI T E MIURA T. Hirsutina, um alcaloide indol de *Uncaria rhynchophylla*, inibe o estágio tardio no ciclo de vida do vírus da dengue. *Frente. Microbiol.* 8:1674. doi:10.3389/fmicb.2017.01674

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research, 2021.

ISLAM, A. B. M. M. K. et al. Animal models for SARS-CoV-2 research. *Virologica Sinica*, v. 36, n. 3, p. 472–482, 2021. DOI: 10.1007/s12250-021-00367-0.

ISRAELOW, B., SONG, E., MAO, T., LU, P., MEIR, A., LIU, F., ALFAJARO, M. M., WEI, J., DONG, H., HOMER, R. J., RING, A., WILEN, C. B., & IWASAKI, A. (2020). Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling. *The Journal of experimental medicine*, 217(12), e20201241. <https://doi.org/10.1084/jem.20201241>

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHOE, H.; MIZIORKO, J. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research, 2022.

JIANG, R.-D.; LIU, M.-Y.; CHEN, Y.; SHAN, C.-Y.; ZHOU, Y.-W. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme

2. *Cell*, v. 182, n. 1, p. 50–58.e8, 2020.

Jl, C.; CHANG, C.; LEE, K. Molecular Factors and Pathways of Hepatotoxicity Associated with HIV/SARS-CoV-2 Protease Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9, p. 7938, 2023.

JIN, Y.; YANG, H.; JI, W.; WU, W.; CHEN, S. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. *Viruses*, v. 12, n. 4, p. 372, 2020.

JIN, Z., DU, X., XU, Y. et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* 582, 289–293 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>

JONCO, J. S. Aplicação de metodologias in silico de predição de toxicidade de substâncias bioativas candidatas a fármacos para o tratamento da COVID-19. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Brasil, 2022.

KANDER, M. C.; CUI, Y.; LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 21, n. 5, p. 1024–1032, 2017. DOI: 10.1111/jcmm.13038.

KONTOYIANNI, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1647, 255–266. 2017. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7201-2_18

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., & FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3–25. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)

LIU, G.; ZHANG, H.; WANG, Y. A highly susceptible hACE2-transgenic mouse model for SARS-CoV-2 research. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 2024.

LIU, K., TANG, M., XU, W., MENG, X., JIN, H., HAN, M., PU, J., LI, Y., JIAO, F., SUN, R., SHEN, R., LUI, K. O., LU, L., & ZHOU, B. An inducible hACE2 transgenic mouse model recapitulates SARS-CoV-2 infection and pathogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(25), e2207210120. 2023. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207210120>

MAIA, E. H. B., ASSIS, L. C., DE OLIVEIRA, T. A., DA SILVA, A. M., & TARANTO, A. G. Structure-Based Virtual Screening: From Classical to Artificial Intelligence. *Frontiers in chemistry*, 8, 343. 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00343>

MATTOS, C. F. Análises in silico para avaliação de fármacos potencialmente eficazes contra o SARS-CoV-2. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2022.

MERCK SHARP & DOHME CORP. COVID-19 – Infecções – Manual MSD Versão Saúde para a Família. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/covid-19/covid-19>.

Acesso em: 15 set. 2025.

OLIVEIRA, M. M.; SCHNEIDER, A. H.; SOUZA, C. Evaluation of acute and subchronic toxicity in Swiss mice: A regulatory and scientific perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 112, p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104623>.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Situação da COVID-19 nas Américas. 2020.

PEPE, V. L. E.; NOVAES, H. M. D.; OSORIO-DE-CASTRO, C. G. S. COVID-19 and the medicines regulation challenges in times of pandemic. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 26, n. 10, p. 4693–4702, 2021.

RODRIGUES, J. L. et al. Toxicological evaluation of new bioactive compounds in Swiss mice: systemic and histopathological outcomes. *Toxicology Reports*, v. 8, p. 145–155, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750021000127>.

SANTIAGO-SILVA, K. M; ALMEIDA, L. B; SOUZA, OLIVEIRA, B. G, PAULA, L. H, NOGUEIRA, H, H. In silico approach identified benzoylguanidines as SARS-CoV-2 main protease (Mpro) potential inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1–14, set. 2022.

SHEREEN, M. A; KHAN, S; KAZMI, A; BASHIR, N; SIDDIQUE, R. COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V., jul. 2020.

Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H.-Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bio availability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036371>

WHO. World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-ihc-\(2005\)-emergency-committee-on-the-covid-19-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-ihc-(2005)-emergency-committee-on-the-covid-19-pandemic). Acesso em: 03 dez. 2025.

ZERVOPOULOU, E.; GRIGORIOU, M.; DOUMAS, S. A.; YIANNAKOU, D.; PAVLIDIS, P.; GASPARDONI, G.; WALTER, J.; FILIA, A.; GAKIOPOULOU, H.; BANOS, A.; MITROULIS, I.; BOUMPAS, D. T. Enhanced medullary and extramedullary granulopoiesis sustain the inflammatory response in lupus nephritis. *Lupus Science & Medicine*, v. 11, n. 1, p. e001110, 2024. DOI: 10.1136/lupus-2023-001110.

ZHU, N; ZHANG, D; WANG, W; LI, X; YANG, B. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 8, p. 727–733, fev. 2020.

4 HIPÓTESE

- 1) A exposição intranasal aos compostos LMed-136 e RTB-182 não modifica parâmetros de integridade tecidual ou equilíbrio redox no fígado, jejuno, rim e baço de camundongos Swiss machos e fêmeas.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil toxicológico dos compostos LMed-136 e RTB-182 administrados por via intranasal em camundongos Swiss, considerando diferenças potenciais entre machos e fêmeas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar as alterações histopatológicas em fígado, jejuno, rim e baço após exposição aos compostos;
- 2) Quantificar os marcadores de estresse oxidativo (TBARS, MDA, GST, FRAP) nesses tecidos;
- 3) Comparar as respostas entre machos e fêmeas, destacando possíveis diferenças sexo-dependentes no padrão de toxicidade;
- 4) Determinar se a administração intranasal dos compostos LMed-136 e RTB-182 gera efeitos tóxicos sistêmicos mensuráveis por meio de análise histopatológica e indicadores de estresse oxidativo.

TOXICIDADE SEXO-DEPENDENTE DOS COMPOSTOS LMED-136 E RTB-182 ADMINISTRADAS POR VIA INTRANASAL EM CAMUNDONGOS SWISS

João Victor Sobreira Xavier¹, Fernando Henrique Borges³, Juliana Rubira Gerez⁴, Luciana Balbo¹, Glaura S. A. Fernandes², Ana Paula F. R. Loureiro Bracarense^{1*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

³ Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁴ Pontífica Universidade Católica, Londrina, Paraná, Brasil

* Corresponding author at: Laboratory of Animal Pathology, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, km 380, 86057-970, Londrina/PR, Brazil.

Resumo

O desenvolvimento de antivirais para SARS-CoV-2 ainda requer avaliações toxicológicas que considerem o dimorfismo sexual como modulador crítico de respostas adversas a fármacos. Este estudo investigou o perfil toxicológico e a resposta ao estresse oxidativo induzidos pelos compostos antivirais LMed-136, benzoilguanidinas com potencial inibidor de Mpro, e RTB-182, derivado de cumarina com potencial inibidor de RdRp, em camundongos Swiss machos e fêmeas tratados por via intranasal durante sete dias. Os animais foram distribuídos em oito grupos (n=8 por grupo), recebendo LMed-136 (0,66 mg/mL) ou RTB-182 (0,545 mg/mL). Posteriormente os animais foram eutanasiados e fragmentos do fígado, rim, baço e jejuno foram submetidos a análise histopatológica, marcadores da lipoperoxidação (TBARS, MDA) e da capacidade antioxidante (atividade de GST e FRAP). Observou-se dimorfismo sexual acentuado, com o fígado como principal órgão-alvo. Em machos, RTB-182 elevou significativamente TBARS hepático ($p<0,05$) e promoveu maiores escores de lesão, incluindo degeneração hepatocelular, vacuolização citoplasmática e focos necróticos. Em contraste, LMed-136 reduziu de forma significativa os escores de lesão ($p=0,0017$), indicando hepatoproteção relativa. Fêmeas mantiveram escores hepáticos mais sutis e exibiram resposta antioxidante distinta, com aumento de GST no grupo RTB-182. Baço e jejuno permaneceram sem alterações morfológicas relevantes, enquanto o rim apresentou aumento lesional apenas em machos tratados com RTB-182, sem reflexo nos biomarcadores oxidativos. O composto LMed-136 demonstrou segurança hepatocelular e renal superior à observada para o RTB-182, configurando-se como candidato mais viável para progressão em estudos pré-clínicos. Os achados reforçam que o sexo é variável biológica crítica na modulação da toxicidade hepática induzida por antivirais experimentais, alinhando-se às diretrizes regulatórias para inclusão de estratificação por sexo em pesquisas translacionais.

Palavras-chave: Toxicidade experimental; homeostase redox; antivirais; segurança farmacológica; dimorfismo sexual.

Introdução

A declaração da pandemia de COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020 evidenciou a magnitude global da emergência sanitária (OPAS, 2020). O Brasil destacou-se como um dos principais epicentros da doença, acumulando elevada carga de morbimortalidade. De acordo com dados do Ministério da Saúde, até setembro de 2025 o país havia registrado mais de 39,3 milhões de casos confirmados e ultrapassado 716 mil óbitos atribuídos à COVID-19 (BRASIL, 2025). Esse cenário evidenciou a urgência na identificação de novas estratégias terapêuticas.

Uma das principais abordagens adotadas durante o início da pandemia foi o reposicionamento farmacológico de fármacos já aprovados, visando acelerar sua disponibilidade terapêutica. Contudo, os medicamentos inicialmente testados contra o SARS-CoV-2, como lopinavir/ritonavir e remdesivir, apresentaram limitações substanciais em eficácia clínica, além de desafios relacionados ao suprimento global, reforçando a necessidade de descobrir novos compostos antivirais escaláveis, com potência adequada e perfil de segurança robusto (Riva *et al.*, 2020). Ensaios de triagem identificaram diversas moléculas com atividade antiviral *in vitro* (Riva *et al.*, 2020; Pushpakom *et al.*, 2019). Todavia, a translação dessas moléculas para o uso clínico depende de avaliações toxicológicas profundas, ainda insuficientemente exploradas em modelos pré-clínicos e clínicos (Zatti *et al.*, 2023; Mullen *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o desenvolvimento das moléculas como LMed-136 e RTB182 representa uma iniciativa voltada à obtenção de candidatos antivirais inovadores. Análises *in silico* e ensaios *in vitro* realizados previamente pelo grupo de pesquisadores da UEL identificaram esses compostos como potenciais inibidores de protease principal do SARS-CoV-2 (Mpro) e da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), respectivamente, exibindo elevada afinidade de ligação, propriedades físico-químicas favoráveis e baixa citotoxicidade, o que justifica sua progressão para estudos toxicológicos *in vivo* (Santiago-Silva *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022). Diferentemente de modelos destinados ao estudo da infecção viral, este trabalho emprega um delineamento exclusivamente toxicológico, visando caracterizar efeitos sistêmicos decorrentes da exposição a essas moléculas.

Para tal, os camundongos Swiss foram selecionados como modelo

experimental devido à sua ampla utilização em toxicologia e farmacologia, variabilidade genética representativa e responsividade metabólica, o que favorece a detecção de possíveis efeitos adversos em órgãos metabolicamente ativos (Choudhary *et al.*, 2022). Além disso, as propriedades estruturais das substâncias, derivadas de modelagem molecular, indicam baixo potencial de formação de metabólitos reativos, permeabilidade adequada e mínima interferência em enzimas críticas, configurando-as como candidatas apropriadas para investigação pré-clínica aprofundada (Santiago-Silva *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022).

A via intranasal, utilizada neste estudo, apresenta características singulares que reforçam sua relevância tanto farmacológica quanto toxicológica. Essa rota permite o transporte direto de substâncias ao sistema nervoso central (SNC) pelas vias olfatória e trigeminal, ultrapassando parcialmente a barreira hematoencefálica e proporcionando maior biodisponibilidade e início de ação acelerado (Keller *et al.*, 2022). Contudo, tais vantagens também implicam riscos toxicológicos importantes, incluindo irritação e lesão da mucosa nasal, epistaxe, inflamação e, em casos extremos, perfuração septal. O potencial de interação direta com estruturas neurais representa, adicionalmente, um risco quando moléculas ou excipientes possuem propriedades neurotóxicas, justificando análises rigorosas de segurança associadas à administração intranasal.

Outro aspecto fundamental da toxicologia contemporânea refere-se à inclusão do sexo como variável biológica obrigatória. Machos e fêmeas apresentam diferenças significativas em metabolismo, resposta inflamatória, capacidade antioxidante e susceptibilidade tecidual, resultando em perfis toxicológicos potencialmente distintos frente a um mesmo xenobiótico (Kander; Liu, 2017; Clayton, 2016; Austad & Fischer, 2016). Assim, a avaliação comparativa entre os sexos torna-se indispensável para assegurar a robustez e a generalização dos achados toxicológicos.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo avaliar, de forma integrada, os efeitos toxicológicos e oxidativos induzidos pelos compostos LMed-136 e RTB182 administrados por via intranasal em camundongos Swiss machos e fêmeas. A investigação concentra-se na caracterização de alterações histopatológicas e no equilíbrio redox em fígado, rins, baço e jejuno, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos e fornecendo subsídios essenciais para o desenvolvimento seguro e eficaz de novos candidatos antivirais.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (n=8 animais por grupo), com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas durante o período experimental. Os animais foram alojados em gaiolas contendo no máximo sete ou oito indivíduos do mesmo sexo por caixa, com acesso *ad libitum* à ração (Nuvilab CR-1®, Nuvital®, Curitiba, Paraná, Brasil) e água. O ambiente foi mantido a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas (luzes acesas das 6:00 às 18:00). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (OF. CIRC. CEUA nº 115/2022) seguindo o Código Brasileiro para Utilização de Animais em Laboratório.

Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, de acordo com o sexo, em oito grupos experimentais (n = 8 por grupo), conforme a Tabela 1. Considerando o dimorfismo sexual inerente, foram adotados cuidados específicos durante o manejo e análise, incluindo: alojamento separado por sexo para evitar interferências hormonais entre machos e fêmeas, e análise estatística estratificada por sexo para identificação respostas diferenciadas à toxicidade, conforme ilustrado na Figura 1. Essas medidas garantiram a avaliação adequada das variações sexuais na suscetibilidade aos compostos testados.

TABELA 1 – Distribuição dos grupos experimentais, sexo e tratamento aplicado.

Grupos – Machos	Tratamento	Grupos – Fêmeas
MC-	Solução salina (controle negativo)	FC-
MC+	Veículo (solução salina + <i>tween</i>)	FC+
LMed-136	Composto LMed-136	LMed-136
RTB-182	Composto RTB-182	RTB-182

Fonte: Próprio autor.

Os animais receberam uma única administração intranasal diária durante sete dias consecutivos, nas concentrações de 0,66 mg/mL para o composto LMed-136 e 0,545 mg/mL para o composto RTB182. A eficácia antiviral desses compostos foi avaliada por meio do índice de seletividade (IS) e da concentração necessária para inibir 50% da atividade viral (IC_{50}). O composto LMed-136 apresentou IS = 60,5 e IC_{50} = 6,6 µg/mL, enquanto o RTB182 apresentou IS = 7,8 e IC_{50} = 5,45 µg/mL.

Ao final do período de tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório (60% de saturação) e submetidos ao deslocamento cervical.

Fragmentos do fígado, rins, baço e jejuno foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% para análise histopatológica. Para as análises de resposta ao estresse oxidativo as amostras foram congeladas a -80°C até seu processamento.

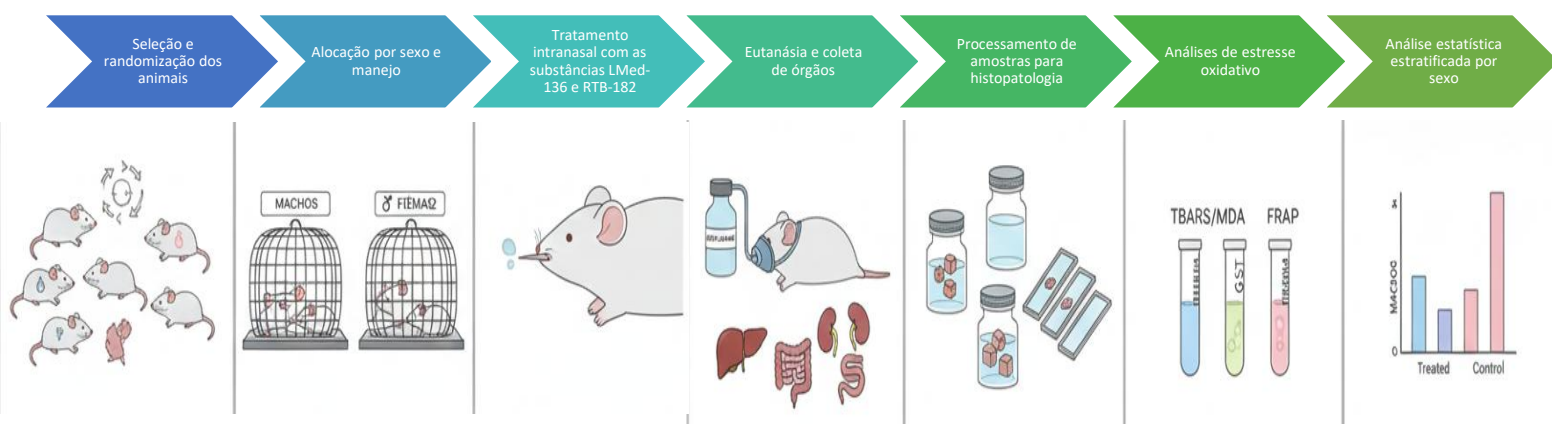


Figura 1– Fluxograma experimental do estudo de toxicidade intranasal dos compostos LMed-136 e RTB-182 em camundongos machos e fêmeas.

Fonte: Próprio autor.

Análise histopatológica

Os fragmentos teciduais foram fixados por 24 horas, sendo posteriormente desidratados em soluções crescentes de álcoois, incluídos em blocos de parafina e seccionados à 5 μ m de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e aplicou-se um escore morfológico para avaliação das lesões teciduais em cada órgão.

A análise histopatológica foi realizada às cegas quanto à identificação dos grupos experimentais, de modo a evitar viés de interpretação. Os achados histológicos foram avaliados por meio de um escore lesional previamente estabelecido (adaptado de Terciolo *et al.*, 2019), conforme descrito na Tabela 2. Esse escore permite a classificação quantitativa das lesões observadas, atribuindo graus que refletem a intensidade e extensão do dano tecidual.

TABELA 2 – Critérios do escore lesional para análise histopatológica.

Órgão	Critério (Fator de Severidade)	Escore Total Máximo
Intestino	Vacuolização citoplasmática (1)	39
	Dilatação linfática (1)	
	Atrofia de vilosidades (2)	
	Fusão de vilosidades (2)	
	Edema (2)	

Rim	Achatamento de enterócitos (2)	27
	Necrose (3)	
	Congestão (1)	
	Debris celulares (1)	
	Vacuolização citoplasmática (1)	
	Vacuolização nuclear (1)	
	Infiltrado inflamatório (2)	
Baço	Necrose (3)	36
	Hiperplasia linfóide (1)	
	Depleção linfóide (1)	
	Apoptose (1)	
	Mitose (1)	
	Histiocitose (2)	
	Infiltrado inflamatório (2)	
Fígado	Necrose (3)	33
	Desorganização trabecular (1)	
	Infiltrado inflamatório (1)	
	Vacuolização citoplasmática (1)	
	Vacuolização nuclear (1)	
	Megalocitose (2)	
	Apoptose (2)	
	Necrose (3)	

Fonte: Próprio autor.

Análise da resposta ao estresse oxidativo

Lipoperoxidação (TBARS)

Os tecidos foram preparados e reagiram com uma solução contendo cloreto férrico (5 µL), ácido ascórbico (5 µL), ácido tricloroacético (50 µL) e ácido tiobarbitúrico (50 µL). As amostras foram incubadas em banho-maria a 90°C por 15 minutos e resfriadas imediatamente. A absorbância foi medida a 535 e 572 nm, e os níveis de TBARS foram calculados como $(A_{535} - A_{572}) / \text{fator de diluição} / \text{proteína}$, expressos em nmol TBARS/mg de proteína (Draper *et al.*, 1993).

Malondialdeído (MDA)

O MDA produzido durante a peroxidação lipídica reagiu com ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o aduto $(TBA)_2\text{-MDA}$, cuja absorbância foi medida a 532 nm. Os resultados foram expressos em µM MDA/mg de proteína (Gutteridge, 1986).

Análise da capacidade antioxidante

Poder Redutor do Ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo ensaio FRAP, que mede a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} em pH baixo, formando um complexo colorido proporcional à atividade antioxidante (Benzie; Strain, 1996).

Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada pela conjugação do GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), monitorada espectrofotometricamente para avaliar a atividade enzimática nos tecidos (Habig *et al.*, 1974).

Normalização e Controle Experimental

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA). Todos os resultados obtidos nos ensaios oxidativos e antioxidantes foram normalizados de acordo com a concentração proteica individual de cada amostra, assegurando comparabilidade entre os grupos experimentais.

Análise Estatística

Os dados foram analisados inicialmente pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade, seguido pelo teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade.

Para os dados paramétricos, foi aplicado o teste de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Fígado

Os principais achados microscópicos no fígado dos animais controles foram vacuolização citoplasmática de hepatócitos (Figura 3). Nos camundongos tratados com os compostos teste observou-se megalocitose e necrose focal de hepatócitos (Figura 4). As alterações foram mais frequentes em machos. A análise do escore lesional indicou uma redução significativa ($p=0,0017$) de alterações nos machos tratados com o composto LMed-136 (Figura 2) em comparação com os grupos MC+ e RTB-182. Nas fêmeas não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2).

A vacuolização dos hepatócitos observada nos animais controle pode estar associada a uma elevada deposição de glicogênio. Já nos animais expostos aos compostos teste, esse achado foi pouco frequente, sugerindo que ocorreu depleção de glicogênio. Por outro lado, morte celular foi evidenciada, caracterizada por focos de necrose, indicando toxicidade dos compostos nos machos. Tais lesões podem estar relacionadas à ação de agentes antivirais com potencial hepatotóxicos, considerando o papel central do fígado na captação, metabolização e excreção desses compostos (Li *et al.*, 2022).

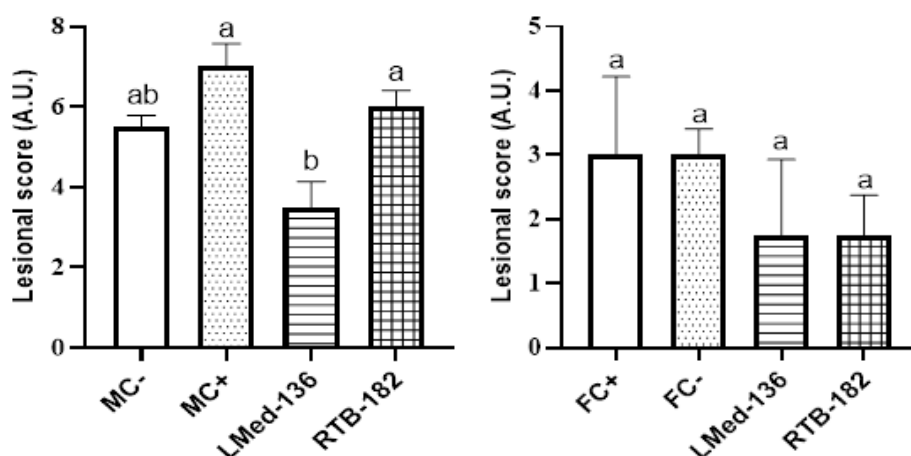


Figura 2 – Avaliação do escore lesional do fígado de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. U.A.= Unidades arbitrárias.

Fonte: Próprio autor.

Esses resultados indicam que as fêmeas apresentaram menor susceptibilidade ou maior resistência hepática sob as condições experimentais avaliadas, possivelmente associadas as diferenças hormonais e metabólicas, especialmente quanto à atividade de enzimas antioxidantes entre os machos.

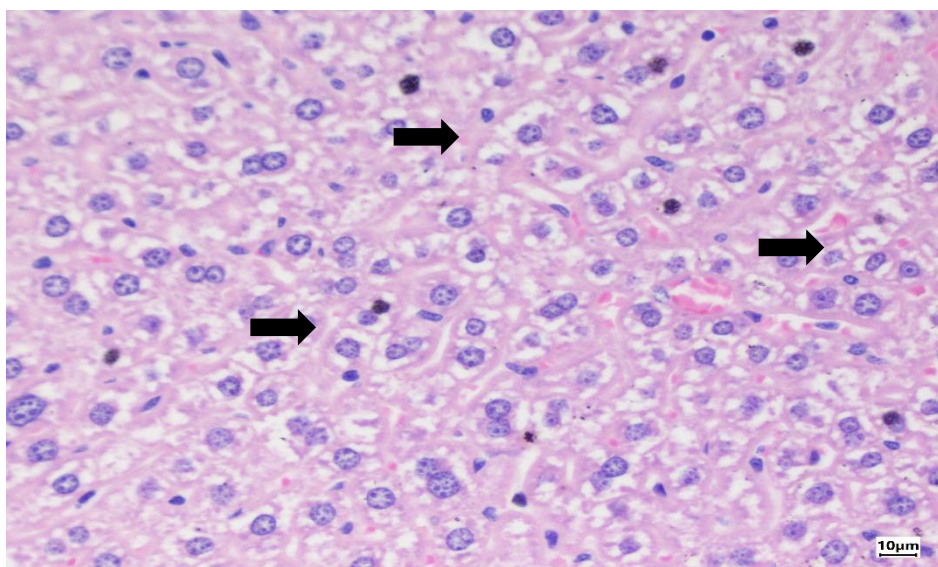


Figura 3 – Fotomicrografia de fígado de camundongo Swiss fêmeas exposto por via intranasal ao composto com solução salina. Observa-se vacuolização citoplasmática de hepatócitos (setas). HE. Barra de escala 10 µm.

Fonte: Próprio autor

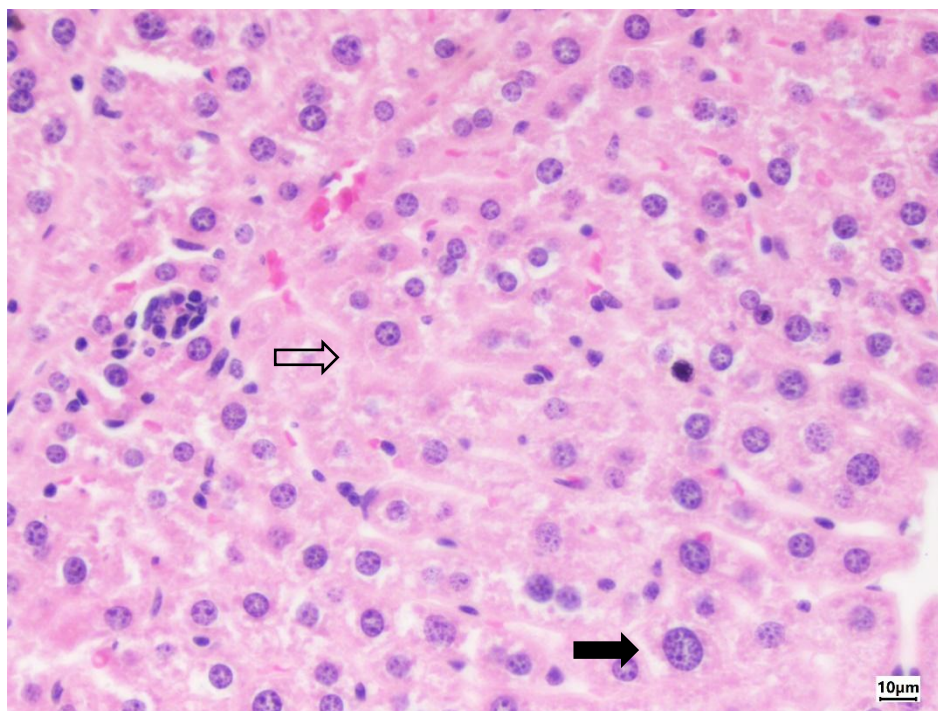


Figura 4 – Fotomicrografia de fígado de camundongo Swiss macho exposto por via intranasal ao composto RTB-182. Observa-se necrose focal de hepatócitos (seta vazada) e megalocitose (seta preta). HE. Barra de escala 10 μm .

Fonte: Próprio autor

Estudos prévios relataram que fármacos antivirais utilizados no tratamento do SARS-CoV-2, como lopinavir e ritonavir, podem causar hepatotoxicidade significativa e, que da mesma forma que as substâncias testadas, estes fármacos também possuem propriedades de inibição das proteases (Mpro) (Alnamshan, 2022; Piplani *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2020).

As enzimas envolvidas nas reações de biotransformação de fase I, especialmente os membros da família do citocromo P450 (CYP450), e as enzimas de fase II, responsáveis pela conjugação dos fármacos a moléculas endógenas, possuem importância crucial nesse processo (Li *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). A disfunção nesses sistemas pode resultar no dano celular inicial, induzido pelo próprio fármaco, ou resultar na formação de metabólitos reativos capazes de se ligarem covalentemente a macromoléculas celulares ou de induzir dano mitocondrial, promovendo estresse oxidativo e ativação de vias de sinalização intracelular (Garcia-Cortes *et al.*, 2020; Villanueva-Paz *et al.*, 2021).

Dessa forma, a exposição do antiviral pode comprometer a atividade das

enzimas do CYP e das proteínas transportadoras, culminando em desequilíbrios no estado redox, prejuízo na excreção de metabólitos e perda da homeostase celular – eventos típicos da lesão hepática induzida por fármacos (Zhao *et al.*, 2021).

No contexto do dano oxidativo hepático, os níveis de TBARS revelaram padrão dimórfico entre os sexos. Em machos, apenas o grupo tratado com RTB-182 apresentou aumento significativo, indicando intensificação da peroxidação lipídica, enquanto os demais grupos (MC+, MC- e LMed-136) mantiveram valores basais (Figura 5). Em contraste, as fêmeas exibiram maior sensibilidade ao dano lipídico, com os grupos tratados com LMed-136 e RTB-182, apresentando aumentos significativos em relação aos respectivos controles (Figura 5).

Quanto ao marcador MDA, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em ambos os sexos, sugerindo que esse parâmetro permaneceu estável sob as condições experimentais testadas.

Esses resultados indicam que TBARS constitui marcador mais sensível ao dano oxidativo hepático induzido pelas substâncias avaliadas, enquanto MDA não respondeu aos tratamentos nas mesmas condições.

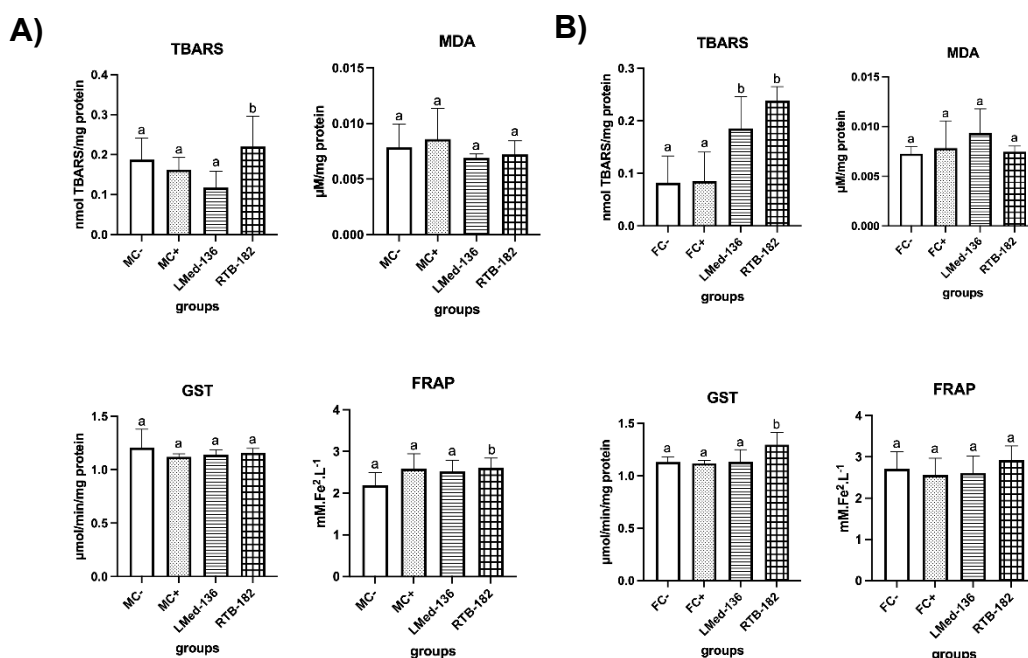


Figura 5 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no fígado de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).

Fonte: Próprio autor.

No contexto antioxidante, a atividade de GST apresentou padrão divergente entre os sexos. Nos machos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Nas fêmeas, o grupo tratado com RTB-182 exibiu aumento significativo na atividade de GST, indicando intensificação da defesa enzimática antioxidante nesse grupo (Figura 5).

A capacidade antioxidante total, mensurada pelo ensaio FRAP, revelou resposta seletiva apenas em machos. O grupo tratado com RTB-182 apresentou incremento significativo nos valores de FRAP (Figura 5), sugerindo mobilização de defesas antioxidantes não-enzimáticas em resposta ao aumento de peroxidação lipídica observado neste grupo. Nas fêmeas, a capacidade antioxidante total manteve-se estável entre todos os grupos, sem diferenças estatisticamente relevantes.

A correlação entre dano oxidativo e resposta antioxidante revela dimorfismo sexual pronunciado, demonstrando que os machos ativaram primariamente defesas não-enzimáticas (FRAP), enquanto fêmeas intensificaram mecanismos enzimáticos (GST). Essa divergência adaptativa explica e relaciona a manifestação diferencial de alterações histopatológicas ressaltadas anteriormente. No grupo dos machos RTB-182, o incremento significativo de TBARS correlacionou-se com dano hepatocelular, refletindo insuficiência de defesas não-enzimáticas em conter lipoperoxidação. Nas fêmeas, elevações similares de TBARS não produziram lesões comparáveis, atribuível à ativação compensatória de GST, que neutralizou produtos de oxidação antes da instalação de dano irreversível. Sob perspectiva dimórfica, indivíduos do sexo masculino apresentam níveis basais mais elevados de oxidação e menor capacidade antioxidante relativamente às fêmeas (Toda *et al.*, 2023), predispondo-os a maior vulnerabilidade hepatocelular.

A peroxidação lipídica constitui mecanismo primordial de lesão hepática, quantificada por TBARS e MDA (Ore *et al.*, 2019; Arauz *et al.*, 2016). A dissociação entre elevações de TBARS e MDA reflete fases distintas da cascata oxidativa (Ore *et al.*, 2019; Arauz *et al.*, 2016), com implicações funcionais divergentes. Antivirais, particularmente inibidores de protease como Molnupiravir, induzem dano oxidativo hepatocelular dose-dependente, caracterizado por incremento de produtos de oxidação e depleção de capacidade antioxidante (Tanbek; Sandal, 2023).

Resultados similares foram observados em pacientes com COVID-19, nos

quais aumentos de MDA associaram-se à diminuição de enzimas antioxidantes, evidenciando que tanto a infecção quanto a intervenção antiviral comprometem a homeostase redox hepática (Pavlova *et al.*, 2025). A intensidade desse dano é modulada por fatores intrínsecos ao hospedeiro, incluindo sexo, atividade metabólica mitocondrial e disponibilidade de sistemas antioxidantes (Li *et al.*, 2015)

O fígado dispõe de sistemas antioxidantes complementares, cuja ativação é modulada conforme natureza, intensidade e duração do estímulo oxidativo (Halliwell; Gutteridge, 2015). A GST exerce papel consolidado na conjugação de xenobióticos e na proteção enzimática frente a espécies reativas de oxigênio e produtos de peroxidação lipídica (Mazari *et al.*, 2023). O ensaio FRAP, por sua vez, expressa a capacidade redutora total do compartimento antioxidante, refletindo integração de defesas enzimáticas e não-enzimáticas (Li *et al.*, 2015).

A elevação de FRAP em machos indica mobilização global do compartimento redutor, sugerindo resposta compensatória defensiva, ao passo que a intensificação de GST em fêmeas representa resposta seletiva voltada à conjugação específica de produtos de oxidação lipídica (Mazari *et al.*, 2023; Sadasivam *et al.*, 2022). Essas estratégias adaptativas diferenciadas refletem capacidade hepática de modular componentes enzimáticos e não-enzimáticos em resposta a agentes tóxicos, caracterizando defesa fisiológica compensatória modulada por dimorfismo sexual hormonal e metabólico (Sadasivam *et al.*, 2022).

Estudos experimentais e clínicos indicam que antivirais interferem significativamente no equilíbrio oxidativo hepático (Tanbek; Sandal, 2023; El-Mahdy *et al.*, 2023). Os aumentos observados de GST em fêmeas e FRAP em machos constituem respostas adaptativas específicas ao composto antiviral testado, refletindo diferenças intrínsecas de sexo, carga oxidativa e capacidade antioxidante basal que, em última análise, determinam a tradução do estresse oxidativo em lesão hepatocelular.

Evidências anteriores demonstram que fêmeas possuem maior potencial antioxidante, com menores níveis de estresse oxidativo e produção reduzida de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que contribui para uma maior proteção tecidual. Esse efeito é, em parte, atribuído a ação do estrogênio e ao potencial antioxidante na neutralização de radicais livres (Kander; Liu, 2017). Assim, o sexo constitui um fator determinante na resposta hepática à injúria experimental, com os machos apresentando maior predisposição às lesões e as fêmeas demonstrando

possível efeito protetor.

Jejuno

A análise microscópica do jejuno dos animais controle revelou vilosidades preservadas, enterócitos colunares revestindo a superfície luminal e dilatação discreta de vasos linfáticos. Nos animais de ambos os sexos expostos aos compostos, edema de lâmina própria e atrofia de vilosidades de discreta intensidade foram os achados mais frequentes (Figura 6). Na análise do escore lesional não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os sexos (Figura 6).

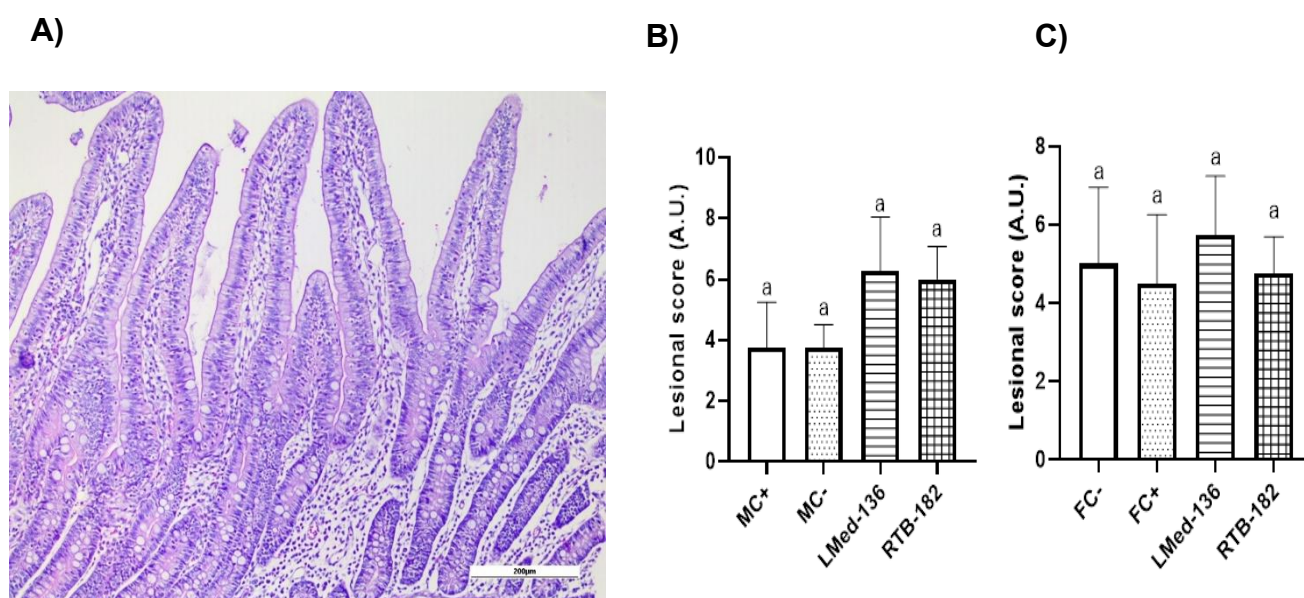


Figura 6 – Jejuno de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do jejuno de camundongo macho do grupo RTB-182. Observa-se discreto edema de lâmina própria. HE. Barra de escala 200 μm. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas. U.A.= Unidades arbitrárias.

Fonte: Próprio autor.

A ausência alterações significativas entre os grupos reforça que as substâncias LMed-136 e RTB-182 não causaram toxicidade no jejuno sob as

condições do experimento. Estudos correlacionam o uso de antivirais, especialmente os inibidores de protease como o ritonavir, à indução de estresse do retículo endoplasmático e comprometimento da integridade do epitélio intestinal em modelos murinos, refletindo disfunção da barreira intestinal e potencial dano aos enterócitos (Zhou, 2011).

Estudos em camundongos infectados por coronavírus murinos (Murine Hepatitis Virus-1), demonstraram alterações histopatológicas no intestino delgado, incluindo atrofia de vilosidades, alteração da arquitetura epitelial e infiltrado inflamatório discreto, evidenciando que insultos virais e farmacológicos podem convergir para remodelações da mucosa intestinal (Hussain *et al.*, 2024).

Nesse contexto, é plausível que a exposição a antivirais possa desencadear alterações em enterócitos, resultando em edema celular e edema da submucosa, culminando em achatamento ou atrofia aparente das vilosidades, concomitantemente à ativação de respostas inflamatórias iniciais (Renga *et al.*, 2013).

O dano lipídico no jejuno, apresentou padrão diferencial entre sexos. Em machos, os níveis de TBARS permaneceram estáveis entre todos os grupos, indicando que os tratamentos não promoveram alterações relevantes na peroxidação lipídica desse segmento intestinal (Figura 7). Em contraste, nas fêmeas, o grupo LMed-136 apresentou redução significativa nos níveis de TBARS em relação aos demais grupos de fêmeas, indicando diminuição da peroxidação lipídica nesse tratamento específico (Figura 7). Esse achado sugere efeito diferencial desta substância entre sexos, refletindo menor suscetibilidade de fêmeas ao estresse oxidativo frente a esse composto, manifestada através de modificação nos níveis de marcadores primários de peroxidação lipídica.

A atividade de GST revelou padrão diferencial entre sexos. Em machos, apenas o grupo LMed-136 apresentou redução significativa, enquanto os demais grupos mantiveram atividade preservada (Figura 7). Esse resultado indica comprometimento seletivo da resposta antioxidante enzimática frente ao tratamento com LMed-136 neste grupo. Em contraste, as fêmeas exibiram estabilidade completa na atividade de GST entre todos os grupos experimentais, demonstrando preservação robusta dessa defesa enzimática (Figura 7).

Os valores de FRAP, representativos da capacidade antioxidante total, permaneceram estáveis em ambos os sexos entre todos os grupos experimentais (Figura 7). Essa manutenção reflete preservação da defesa antioxidante global não-

enzimática, independentemente do tratamento recebido. A combinação de resposta diferencial de GST com estabilidade de FRAP sugere que mecanismos não-enzimáticos compensaram o comprometimento pontual observado no uso do composto LMed-136 nos machos, preservando a capacidade antioxidante total no jejuno.

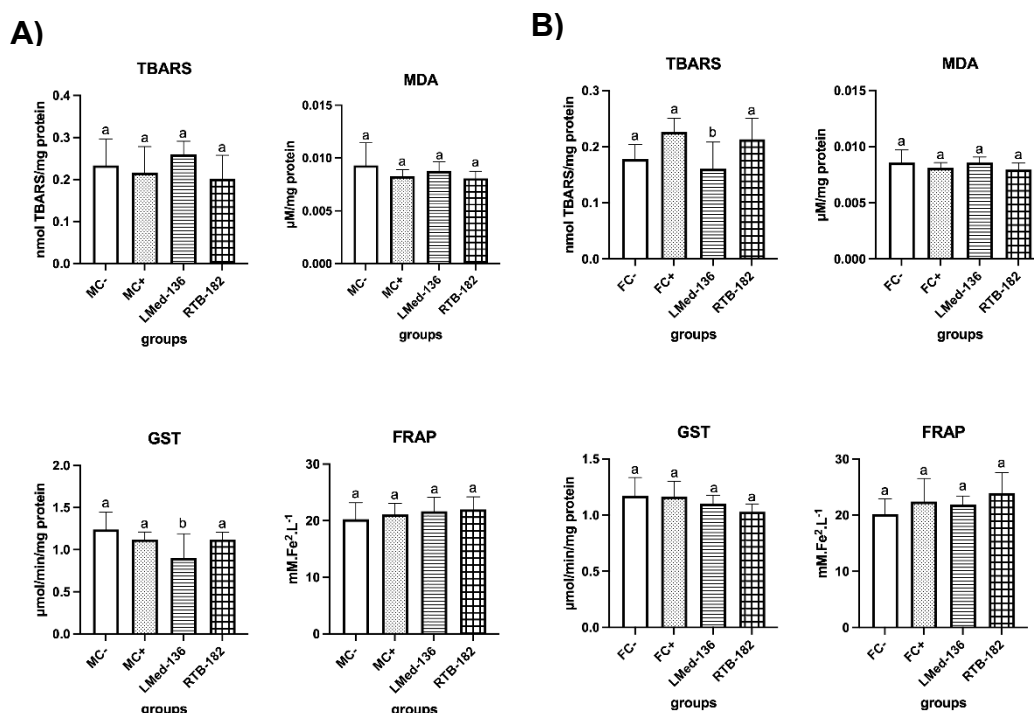


Figura 7 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no jejuno de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).

Fonte: Próprio autor

A resposta antioxidante aprimorada em fêmeas está em consonância com perfil antioxidante mais eficiente já descrito para este sexo em diferentes tecidos, reforçando hipótese de proteção redox intrínseca associada a fatores hormonais (Kander; Liu, 2017). A redução de TBARS em fêmeas tratadas com substância LMed-136 reflete efeito antioxidante adaptativo ou atenuação de processos inflamatórios locais (Wan *et al.*, 2019).

A modulação diferencial entre sexos é reforçada pela interação entre microbiota intestinal, metabolismo xenobiótico e dimorfismo sexual. A microbiota modula metabolismo de fármacos e estresse oxidativo através de regulação

diferencial das enzimas do citocromo P450 (Jourová *et al.*, 2020), contribuindo para o padrão observado — estabilidade redox nos machos versus resposta antioxidante aprimorada nas fêmeas.

A redução de GST no grupo LMed-136 em machos sugere comprometimento seletivo da defesa antioxidante enzimática, frequentemente afetada por antivirais que interferem no metabolismo mitocondrial e redox (Tanbek; Sandal, 2023) Em contraste, estabilidade de FRAP em machos indica preservação de componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante, sugerindo compensação parcial do comprometimento enzimático.

A manutenção de FRAP em ambos os sexos reforça preservação da homeostase redox global no jejuno, independentemente do tratamento. O equilíbrio entre enzimas antioxidantes e compostos não-enzimáticos mostrou-se suficiente para conter aumentos de ROS induzidos por fármacos ou desafios metabólicos, demonstrando capacidade adaptativa robusta desse segmento intestinal mesmo sob exposição a antivirais (Kong *et al.*, 2021; Wan *et al.*, 2019).

Rim

A avaliação histológica do rim demonstrou que a severidade das lesões renais foi mínima em ambos os sexos, mas com tendência a maior severidade nos machos tratados com RTB-182, consistindo principalmente em congestão leve e necrose tubular aguda focal (Figura 8).

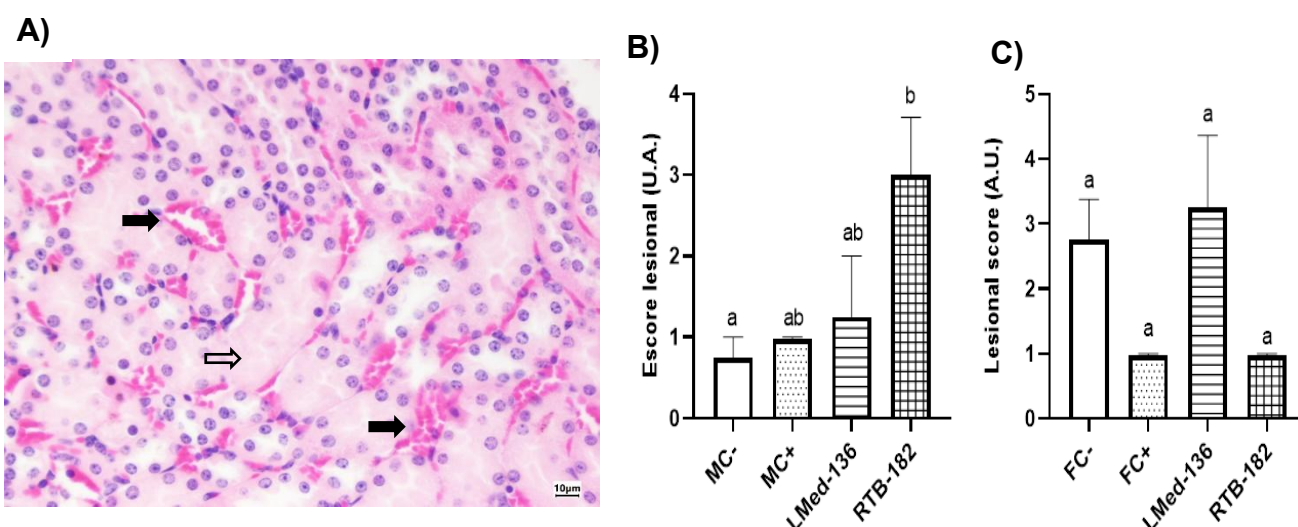


Figura 8 – Rim de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do rim de camundongo

macho do grupo RTB-182. Observa-se congestão vascular (seta preta) e necrose tubular focal (seta vazada). HE. Barra de escala 10 μ m. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas. U.A.= Unidades arbitrárias.

Fonte: Próprio autor

Observa-se que, nos machos, há diferença estatisticamente significativa apenas entre o grupo RTB-182 e o grupo MC-, enquanto MC+ e LMed-136 não diferiram significativamente de nenhum dos demais grupos (Figura 8).

Nas fêmeas, apesar de variações nas médias dos escores lesionais — com FC- apresentando o maior valor médio, seguido por LMed-136 — tais diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 8).

Embora não tenha sido observada significância estatística entre as substâncias avaliadas e a ocorrência de nefrotoxicidade, é importante ressaltar que o desenvolvimento dessa condição pode ser relacionado a mecanismos dependentes da dose, à lesão do epitélio tubular decorrente de acúmulo intracelular, à obstrução tubular por cristais contendo o fármaco ou seus metabólitos ou, ainda, à ocorrência de nefrite intersticial (Kwiatkowska *et al.*, 2021).

Fármacos antirretrovirais, particularmente inibidores de proteases, podem induzir nefrotoxicidade através de mecanismos que envolvem os túbulos proximais, principal sítio de lesão pela filtração renal desses compostos. Inibidores de proteases têm sido associados à formação de urólitos, lesão tubular aguda e nefrite túbulo-intersticial, possivelmente pela interferência no metabolismo da creatinina renal (Milburn *et al.*, 2016; Calza, 2012). Considerando que a substância avaliada no presente estudo apresenta mecanismos de ação e vias metabólicas semelhantes aos desses inibidores, espera-se comportamento nefrotóxico similar.

Além disso, nas células tubulares, esses compostos podem inibir transportadores específicos, aumentando a exposição tubular e favorecendo o desenvolvimento de tubulopatias, bem como manter concentrações plasmáticas elevadas devido à inibição de enzimas do complexo citocromo p450 (Yombi *et al.*, 2014).

A comparação entre machos e fêmeas demonstrou que, ao contrário das alterações hepáticas, as substâncias testadas não induziram lesões histopatológicas significativas nos rins de ambos os sexos. Os escores lesionais renais permaneceram

consistentemente baixos nos grupos tratados e controles, evidenciando a relativa resistência renal ou a ausência de nefrotoxicidade nas condições experimentais avaliadas.

A avaliação do dano oxidativo renal revelou um padrão dimórfico entre os sexos. Em machos, os níveis de TBARS e MDA permaneceram estáveis entre todos os grupos, indicando preservação da homeostase oxidativa renal independentemente da exposição aos compostos testados. Essa estabilidade bioquímica contrasta com o aumento do escore lesional observado no grupo tratado com RTB-182, sugerindo que o dano morfológico renal não está associado a mecanismos oxidativos mensuráveis, pelo menos no contexto dos biomarcadores avaliados. Assim, a peroxidação lipídica não parece atuar como o principal determinante das alterações histopatológicas renais detectadas nos machos (Figura 9).

Em contraste, as fêmeas exibiram resposta oxidativa diferencial. O grupo LMed-136 apresentou aumento significativo de TBARS, evidenciando intensificação da peroxidação lipídica nesse tratamento específico. Quanto ao MDA, observou-se redução significativa nos grupos LMed-136 e, de forma estatisticamente significativa, em RTB-182, quando comparados aos respectivos controles. Essas variações sugerem modificações adaptativas na dinâmica de formação e eliminação dos produtos finais da peroxidação lipídica, com efeito predominantemente manifestado em fêmeas tratadas (Figura 9).

A atividade de GST e a capacidade antioxidante total, mensurada pelo ensaio FRAP permaneceram estáveis em ambos os sexos entre os grupos experimentais, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 9). Esses resultados indicam manutenção eficiente das defesas antioxidantes renais, refletindo preservação dos mecanismos homeostáticos antioxidantes frente aos compostos testados. A ausência de alterações expressivas em ambos os parâmetros antioxidantes sugere que o rim manteve capacidade adaptativa adequada para equilibrar a produção de espécies reativas de oxigênio, mesmo sob desafio oxidativo, evidenciando proteção antioxidante renal.

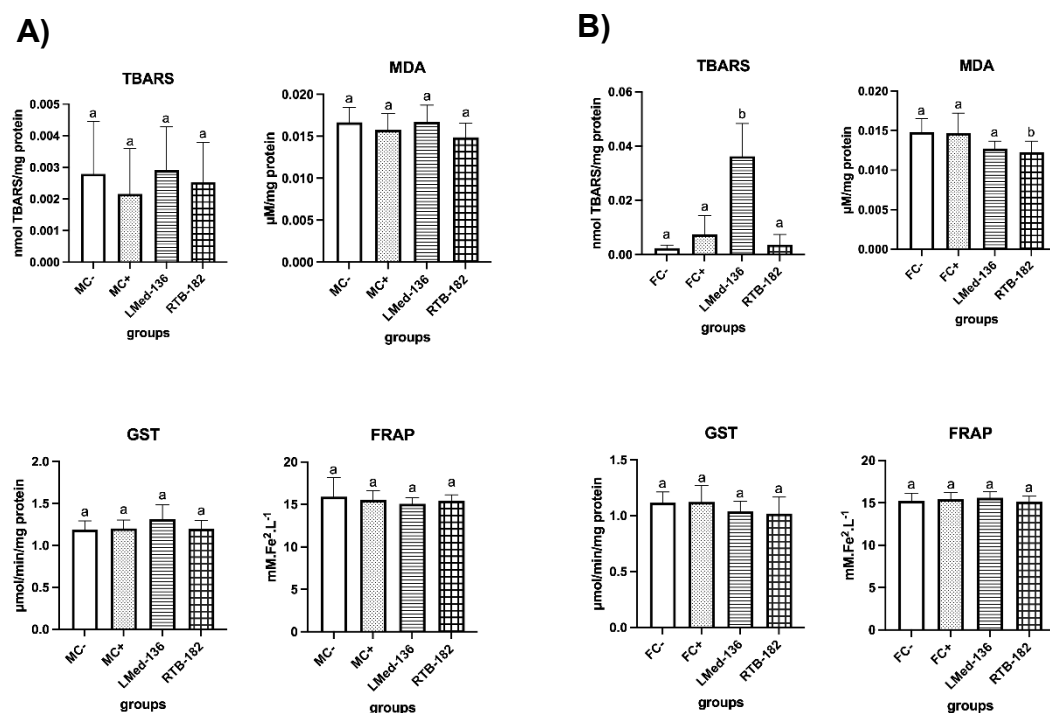


Figura 9 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no rim de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).

Fonte: Próprio autor.

A comparação entre sexos revela padrão diferencial na resposta renal ao estresse oxidativo. Enquanto machos mantiveram estabilidade funcional e oxidativa, as fêmeas apresentaram maior variabilidade nos marcadores de peroxidação lipídica (TBARS e MDA). Apesar dessa divergência, a resposta antioxidante renal permaneceu preservada em ambos os sexos, indicando mecanismos adaptativos eficazes, embora com diferenças na suscetibilidade ao estresse oxidativo conforme o sexo dos animais.

O rim constitui órgão altamente sensível ao desequilíbrio oxidativo em virtude de sua elevada taxa metabólica e abundância de mitocôndrias, fatores que o predispõem à vulnerabilidade frente ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Piko *et al.*, 2023; Krata *et al.*, 2018). A ausência de alterações expressivas nos

machos reflete ativação eficaz de sistemas compensatórios antioxidantes. Contrariamente, as variações observadas nas fêmeas decorrem de diferenças sexuais na expressão de enzimas antioxidantes e na sensibilidade mitocondrial ao estresse oxidativo (Hojs *et al.*, 2020).

Estudos com antivirais corroboram que fármacos como aciclovir e tenofovir desencadeiam nefrotoxicidade, caracterizada por nefromegalia, aumento de MDA e redução de antioxidantes renais. Entretanto, o dano oxidativo renal ocorre predominantemente sob condições de sobrecarga oxidativa, sendo atenuado por mecanismos antioxidantes endógenos ou agentes moduladores (Badawi, 2022; Ramamoorthy *et al.*, 2021).

A manutenção da atividade de GST e dos níveis de FRAP reforça o padrão observado em outros tecidos, indicando que o rim manteve capacidade antioxidante eficiente e mecanismos conjugativos estáveis mesmo sob exposição aos antivirais testados. A preservação desses parâmetros reflete atuação coordenada dos componentes antioxidantes na neutralização das espécies reativas geradas localmente (Piko *et al.*, 2023; Hojs *et al.*, 2020).

O equilíbrio redox renal observado diverge do padrão hepático, sugerindo que os rins não sofreram desafios oxidativos suficientes para induzir respostas adaptativas mensuráveis. Essa diferença alinha-se com evidências de que o rim dispõe de sistemas antioxidantes altamente regulados, capazes de responder seletivamente a insultos oxidativos sem necessariamente gerar mudanças mensuráveis em todos os marcadores clássicos (Krata *et al.*, 2018). Assim, a ausência de variações significativas em GST e FRAP reforçam a atuação eficiente do sistema redox renal, refletindo estado de compensação antioxidante estável e preservação da integridade funcional renal.

Baço

Esporadicamente, foram observadas alterações histopatológicas, como hiperplasia linfóide (Figura 10) e, raramente, células apoptóticas, identificadas de forma irregular e sem padrão definido entre os grupos.

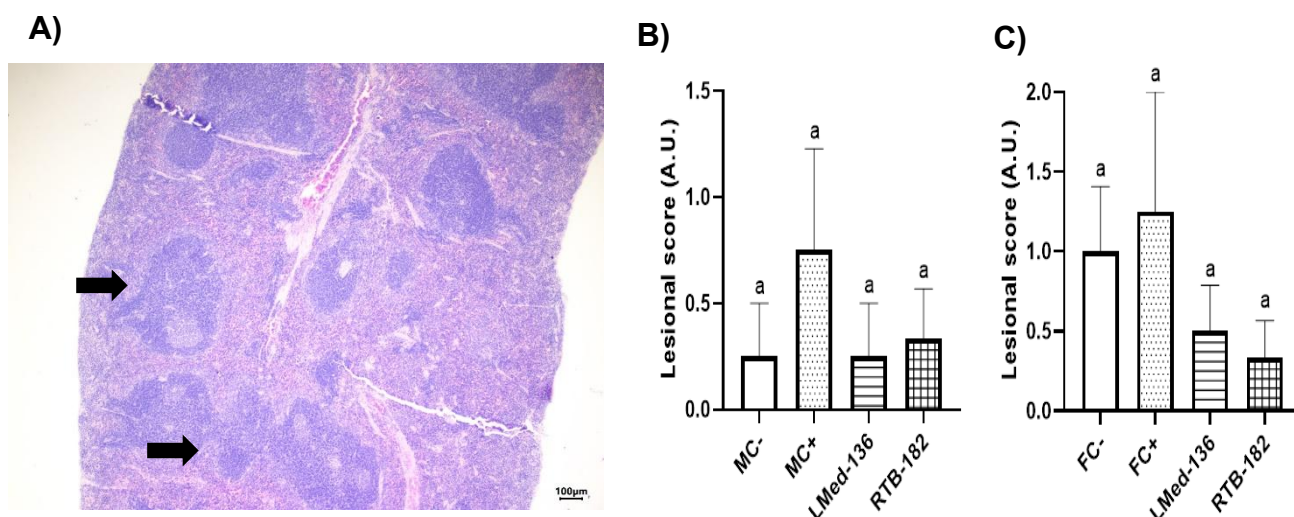


Figura 10 – Baço de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com os compostos LMed-136 e RTB-182 por via intranasal. A) Fotomicrografia do baço de camundongo fêmea do composto LMed-136. Observa-se hiperplasia linfóide evidenciada pelo aumento dos folículos linfáticos na polpa branca (seta preta). HE. Barra de escala 100 µm. B) Avaliação do escore lesional de camundongos Swiss machos. C) Avaliação do escore lesional de fêmeas U.A.= Unidades arbitrárias.

Fonte: Próprio autor.

A avaliação dos escores lesionais do baço demonstrou ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados, tanto em machos quanto em fêmeas (p ajustados $< 0,05$), indicando resposta inflamatória e proliferativa mínima ou ausente (Figura 10).

Embora a análise estatística dos dados não tenha revelado significância, a presença das alterações histológicas mencionadas reforça a possibilidade de ativação imune local e estresse celular induzido pelo antirretroviral, que poderia potencialmente desencadear disfunção mitocondrial, autofagia alterada e morte celular programada, de forma análoga aos mecanismos observados em tecidos linfóides de pacientes com infecção crônica (Duarte *et al.*, 2025).

A análise comparativa entre os sexos não evidenciou diferenças estatisticamente significativas nas alterações histopatológicas esplênicas, indicando resposta tecidual semelhante de machos e fêmeas às substâncias testadas. As estruturas esplênicas mantiveram-se histologicamente preservadas em ambos os sexos, sugerindo ausência de toxicidade direcionada a esse órgão.

O dano oxidativo esplênico revelou resposta diferencial entre sexos. Em

machos, o grupo RTB-182 apresentou níveis significativamente elevados de TBARS em comparação aos demais grupos, indicando intensificação da peroxidação lipídica e maior suscetibilidade esplênica ao dano oxidativo nesse tratamento. Entretanto, os níveis de MDA permaneceram estáveis entre todos os grupos experimentais, sugerindo que a progressão do dano oxidativo não atingiu fase de formação de produtos finais avançados, ou que mecanismos de remoção de produtos intermediários foram ativados eficientemente (Figura 11).

Em contraste, as fêmeas mantiveram estabilidade completa nos marcadores de peroxidação lipídica esplênica, com TBARS e MDA permanecendo semelhantes entre todos os grupos experimentais sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 11).

A atividade de GST e a capacidade antioxidante total, mensurada pelo ensaio FRAP, permaneceram estáveis em ambos os sexos entre os grupos experimentais, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 11). Esses resultados indicam preservação eficiente dos mecanismos de defesa antioxidante e refletem a manutenção da homeostase antioxidante esplênica frente aos tratamentos avaliados. A ausência de alterações expressivas sugere que o baço manteve capacidade adaptativa antioxidante adequada, com integridade funcional preservada durante a exposição aos antivirais testados.

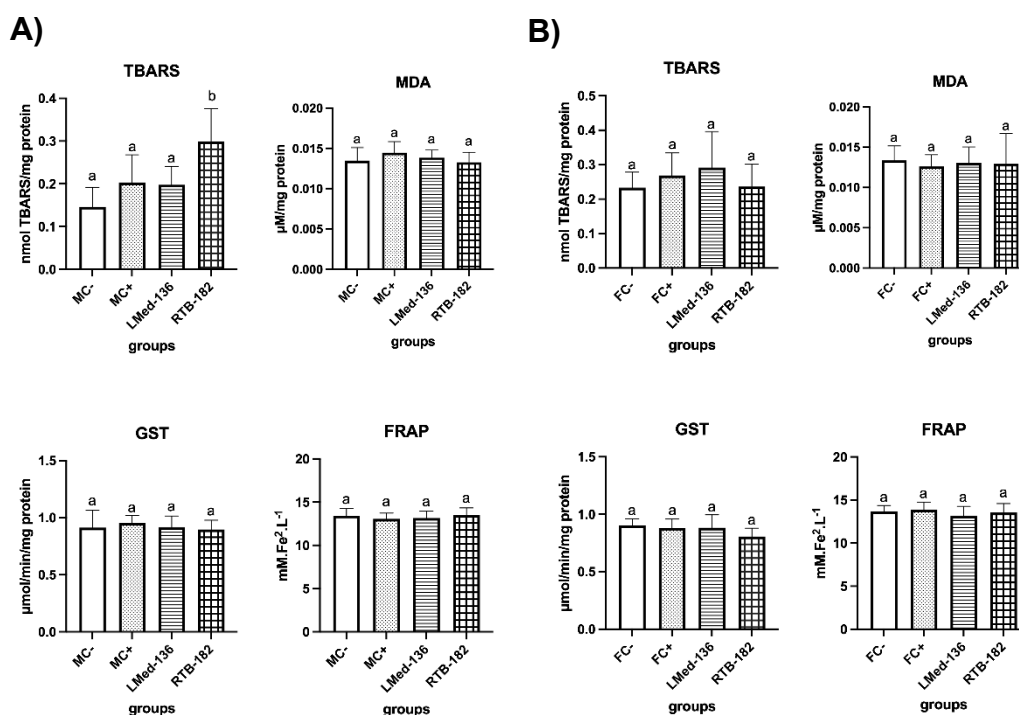


Figura 11 – Análise da resposta ao estresse oxidativo no baço de camundongos Swiss machos (A) e fêmeas (B) tratados com os compostos. Concentrações médias e desvio padrão de marcadores de lipoperoxidação (TBARS e MDA) e potencial antioxidante (GST e FRAP).

Fonte: Próprio autor.

A análise integrada dos marcadores oxidativos e antioxidantes no baço evidencia ausência de toxicidade relevante associada aos compostos testados. Nos machos tratados com RTB-182 observou-se aumento significativo de TBARS; contudo, esse achado isolado, sem concomitantes alterações nos demais biomarcadores, não caracteriza estresse oxidativo esplênico de impacto biológico. Nas fêmeas, todos os parâmetros permaneceram estáveis, indicando preservação do equilíbrio redox, possivelmente atribuída ao efeito modulador do estrogênio sobre a capacidade antioxidante (Kander; Liu, 2017). O aumento pontual de TBARS em machos pode refletir mecanismos de toxicidade mitocondrial, fenômeno descrito para antivirais como molnupiravir e remdesivir, nos quais a disfunção mitocondrial promove desacoplamento oxidativo, incremento da produção de espécies reativas de oxigênio e intensificação da peroxidação lipídica (Kiy et al., 2024; Merches et al., 2022). No conjunto, os achados demonstram manutenção da integridade funcional do tecido esplênico e ausência de efeitos imunotóxicos relevantes.

A manutenção de parâmetros antioxidantes em ambos os sexos reflete capacidade adaptativa do tecido esplênico em sustentar integridade oxidativa sob desafio. Essa preservação é mediada pela regulação do sistema glutatona e ativação de vias de resposta redox frente a fármacos antivirais (Zhang *et al.*, 2023; Kong *et al.*, 2021), permitindo que mecanismos compensatórios antioxidantes se mobilizem eficientemente para neutralizar ROS gerado localmente, conferindo ao baço resiliência funcional especialmente evidente em fêmeas.

Complementarmente, o baço constitui órgão central na hematopoiese extramedular (EMH), particularmente sob inflamação. Sob estímulos inflamatórios, o baço funciona como nicho hematopoiético extramedular (NHE) dinâmico, onde ocorrem migração, expansão e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas e proliferação de linhagens mieloides, com fenótipos pró-inflamatórios caracterizados por elevada capacidade de gerar ROS (Zervopoulou *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2020). Durante toxicidade farmacológica, ativação desse NHE esplênico cria microambiente

pró-oxidante sustentado por liberação contínua de ROS por células mieloides. Esse cenário favorece intensificação do estresse oxidativo local — mecanismo consistente com aumento de TBARS observado no tratamento RTB-182 nos machos. Estudos prévios demonstram que insultos tóxicos e inflamatórios induzem EMH esplênica acompanhada de aumento de ROS e dano lipídico (Shaibi *et al.*, 2022; Chai *et al.*, 2015), sugerindo que recrutamento hematopoiético e inflamatório local constitui fator adicional na geração de dano oxidativo esplênico.

Conclusão

Os compostos LMed-136 e RTB-182 exibiram um perfil toxicológico globalmente favorável com potencial para avanço translacional; entretanto, diferenças relevantes foram identificadas entre eles. O LMed-136 apresentou hepatotoxicidade leve — mais pronunciada em machos —, sem lesões relevantes em rins, baço ou jejuno, além de estimular uma resposta antioxidante compensatória, configurando-se como o candidato mais seguro. Já o RTB-182, embora também apresente toxicidade sistêmica reduzida, induziu lesões renais, predominante no grupo de machos, ainda que sem correspondência em marcadores oxidativos, sugerindo um mecanismo de nefrotoxicidade independente de estresse oxidativo.

A análise integrada de histopatologia e biomarcadores revelou um dimorfismo sexual marcado, com fêmeas exibindo maior resistência hepática, possivelmente relacionada à modulação estrogênica e à maior atividade basal de GST. Com exceção do dano tecidual renal mais pronunciado em machos, os demais tecidos, jejuno e baço, mantiveram integridade estrutural e homeostase redox, reforçando a segurança sistêmica de ambos os compostos.

Esses resultados reforçam a importância da estratificação por sexo em estudos pré-clínicos de antivirais, conforme diretrizes atuais que reconhecem o dimorfismo sexual como variável biológica crítica. O LMed-136 permanece como o candidato mais promissor, e estudos adicionais são recomendados para esclarecer o mecanismo de nefrotoxicidade do RTB-182 e apoiar o desenvolvimento seguro desses compostos como potenciais terapêuticos contra SARS-CoV-2.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os compostos LMed-136 e RTB-182 demonstraram adequada incorporação em solução salina nasal e ausência de toxicidade significativa em camundongos Swiss, corroborando a hipótese inicial do estudo. A avaliação histopatológica revelou hepatotoxicidade e nefrotoxicidade restrita, notadamente em machos, enquanto baço e jejuno mantiveram-se estrutural e funcionalmente preservados.

Evidenciou-se um dimorfismo sexual marcante, com fêmeas apresentando maior proteção hepática, possivelmente mediada por estrogênios e maior atividade de GST, ao passo que machos ativaram predominantemente mecanismos antioxidantes não-enzimáticos (FRAP). Esses resultados apontam para um perfil de segurança favorável dos compostos, destacando o LMed-136 como o candidato de menor toxicidade hepática e, portanto, preferencial para avanços clínicos.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a realização de estudos pré-clínicos adicionais, incluindo caracterização farmacocinética e metabólica, ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade, avaliações de exposição prolongada em diferentes modelos animais e análises moleculares avançadas. Destaca-se a importância da estratificação por sexo, bem como o monitoramento detalhado da função hepática em estudos clínicos, visando validar a segurança e a eficácia dos compostos. Ademais, a investigação do potencial antiviral frente a outros patógenos poderá ampliar o impacto translacional dos achados, fornecendo base sólida para o desenvolvimento racional de novas terapias antivirais.

7 REFERÊNCIAS

- ARAUZ, J.; RAMOS-TOVAR, E.; MURIEL, P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: from bench to bedside. *Annals of Hepatology*, v. 15, n. 2, p. 160–173, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5604/16652681.1193701>
- AUSTAD, S. N., FISCHER, K. E. Sex Differences in Lifespan. *Cell metabolism*, 23(6), 1022–1033. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.019>
- BADAWI, M. Evaluation of the effect of vitamin D on acyclovir-induced renal injury in adult male albino rat. *South Asian Journal of Experimental Biology*, v. 12, n. 3, p. 535, 2022.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. DOI: 10.1006/abio.1996.0292.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- CAI, Q.; HUANG, D.; YU, H.; ZHU, Z.; XIA, Z.; SU, Y.; LI, Z.; ZHOU, G.; GOU, J.; QU, J.; SUN, Y.; LIU, Y.; HE, Q.; CHEN, J.; LIU, L.; XU, L. COVID-19: abnormal liver function tests. *Journal of Hepatology*, v. 73, n. 3, p. 566–574, 2020. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.006.
- CALZA, L. Renal toxicity associated with antiretroviral therapy. *HIV Clinical Trials*, v. 13, n. 4, p. 189–211, 2012. DOI: 10.1310/hct1304-189.
- CHAI, X.; LI, D.; CAO, X.; ZHANG, Y.; MU, J.; LU, W.; XIAO, X.; LI, C.; MENG, J.; CHEN, J.; LI, Q.; WANG, J.; MENG, A.; ZHAO, M. A sobrecarga de ferro mediada por ROS prejudica a hematopoiese da medula óssea, danificando células-tronco/progenitoras hematopoiéticas em camundongos. *Scientific Reports*, v. 5, n. 10181, 2015. DOI: 10.1038/srep10181.
- CHOUDHARY, S.; KANEVSKY, I.; TOMLINSON, L. Animal models for studying COVID-19, prevention, and therapy: pathology and disease phenotypes. *Veterinary Pathology*, v. 59, n. 4, p. 516–527, 2022.
- CLAYTON, J. A. Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. *Nature*, v. 535, p. 25–33, 2016.
- DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 15, n. 4, p. 353–363, 1993. DOI: 10.1016/0891-5849(93)90035-S.
- DUARTE, M. S. L. O.; CARVALHO-SILVA, W. H. V. D.; GUIMARÃES, R. L. The role of autophagy in HIV infection and immunological recovery of ART-treated PLWH. *Viruses*, v. 17, p. 884, 2025. DOI: 10.3390/v17070884.

EL-MAHDY, N. A.; ABOU-SAIF, S.; ABD EL HAMID, M. I.; HASHEM, H. M.; HAMMAD, M. A.; ABU-RISHA, S. E. Evaluation of the effect of direct-acting antiviral agents on melatonin level and lipid peroxidation in chronic hepatitis C patients. *Frontiers in Pharmacology*, v. 14, p. 1128016, 2023. DOI: 10.3389/fphar.2023.1128016.

GARCIA-CORTES, M.; ROBLES-DIAZ, M.; STEPHENS, C.; ORTEGA-ALONSO, A.; LUCENA, M. I.; ANDRADE, R. J. Drug induced liver injury: an update. *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 10, p. 3381–3407, 2020. DOI: 10.1007/s00204-020-02885-1.

GUTTERIDGE, J. M. Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radical Research Communications*, v. 1, n. 3, p. 173–184, 1986. DOI: 10.3109/10715768609083149.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HOJS, N. V.; BEVC, S.; EKART, R.; HOJS, R. Oxidative stress markers in chronic kidney disease with emphasis on diabetic nephropathy. *Antioxidants*, v. 9, n. 10, p. 925, 2020. DOI: 10.3390/antiox9100925.

HUSSAIN, H.; ELUMALAI, N.; SAMPATH, N.; SHAMALADEVI, N.; HAJJAR, R.; DRUYAN, B. Z.; RASHED, A. B.; RAMAMOORTHY, R.; KENYON, N. S.; JAYAKUMAR, A. R.; PAIDAS, M. J. Acute and Long COVID intestinal changes in an experimental model of coronavirus in mice. *Viruses*, v. 16, n. 6, p. 832, 2024. DOI: 10.3390/v16060832.

JOUROVÁ, L.; VAVRECKOVA, M.; ZEMANOVA, N.; ANZENBACHER, P.; LANGOVA, K.; HERMANOVA, P.; HUDCOVIC, T.; ANZENBACHEROVA, E. Gut microbiome alters the activity of liver cytochromes P450 in mice with sex-dependent differences. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 01303, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.01303.

KANDER, M. C.; CUI, Y.; LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 21, n. 5, p. 1024–1032, 2017. DOI: 10.1111/jcmm.13038.

KELLER, L. A.; MERKEL, O.; POPP, A. Intranasal drug delivery: opportunities and toxicologic challenges during drug development. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 12, n. 4, p. 735–757, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00891-5>.

KIY, R. T.; KHOO, S. H.; CHADWICK, A. E. Assessing the mitochondrial safety profile of the molnupiravir active metabolite, β -d-N4-hydroxycytidine (NHC), in the physiologically relevant HepaRG model. *Toxicology Research*, v. 13, n. 1, p. tfae012, 2024. DOI: 10.1093/toxres/tfae012.

KONG, L.; ZHU, L.; YI, X.; HUANG, Y.; ZHAO, H.; CHEN, Y.; YUAN, Z.; WEN, L.; WU, J.; YI, J. Betulinic acid alleviates spleen oxidative damage induced by acute intraperitoneal exposure to T-2 toxin by activating Nrf2 and inhibiting MAPK signaling

pathways. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 158, 2021. DOI: 10.3390/antiox10020158.

KRATA, N.; ZAGOŹDŹON, R.; FORONCEWICZ, B.; MUCHA, K. Oxidative stress in kidney diseases: the cause or the consequence?. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 66, n. 3, p. 211–220, 2018. DOI: 10.1007/s00005-017-0496-0.

KWIATKOWSKA, E.; DOMAŃSKI, L.; DZIEDZIEJKO, V.; KAJDY, A.; STEFAŃSKA, K.; KWIATKOWSKI, S. The mechanism of drug nephrotoxicity and the methods for preventing kidney damage. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 11, p. 6109, 2021. DOI: 10.3390/ijms22116109.

LI, X.; WANG, W.; YAN, S.; et al. Drug-induced liver injury in COVID-19 treatment: incidence, mechanisms and clinical management. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 1019487, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.1019487.

MATIĆ, A.; VUKOVIĆ, R.; HEFFER, M.; et al. Sex differences in oxidative stress level and antioxidative enzymes expression and activity in obese pre-diabetic elderly rats treated with metformin or liraglutide. *Croatian Medical Journal*, v. 62, n. 3, p. 215–226, 2021. DOI: 10.3325/cmj.2021.62.215.

MAZARI, A. M. A.; ZHANG, L.; YE, Z. W.; ZHANG, J.; TEW, K. D.; TOWNSEND, D. M. The multifaceted role of glutathione S-transferases in health and disease. *Biomolecules*, v. 13, n. 4, p. 688, 2023. DOI: 10.3390/biom13040688.

MILBURN, J.; JONES, R.; LEVY, J. B. Renal effects of novel antiretroviral drugs. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 32, n. 3, p. 434–439, 2017. DOI: 10.1093/ndt/gfw064.

MULLEN, P. J.; GARCIA, G.; PURKAYASTHA, A.; et al. SARS-CoV-2 infection reprograms host cell metabolism and is potentially susceptible to mTORC1 inhibition. *Nature Communications*, v. 12, p. 1876, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22166-4.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Situação da COVID-19 nas Américas. 2020.

ORE, A.; AKINLOYE, O. A. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina*, v. 55, n. 2, p. 26, 2019. DOI: 10.3390/medicina55020026.

PAVLOVA, E.; ATANASOV, P.; IVANOV, I.; DYANKOV, G. Biomarkers of oxidative stress in COVID-19 patients. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, p. 3869, 2025. DOI: 10.3390/ijms26083869.

PIKO, N.; BEVC, S.; HOJS, R.; EKART, R. The role of oxidative stress in kidney injury. *Antioxidants*, v. 12, n. 9, p. 1772, 2023. DOI: 10.3390/antiox12091772.

PIPLANI, S.; SINGH, P.; PETROVSKY, N.; WINKLER, D. A. Computational repurposing of drugs and natural products against SARS-CoV-2 main protease (Mpro) as potential COVID-19 therapies. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 9, p. 781039, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.781039.

PUSHAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; ESCOTT, K. J.; HOPPER, S.; WELLS, A.; DOIG, A.; GUILLIAMS, T.; LATIMER, J.; MCNAMEE, C.; NORRIS, A.; SANSEAU, P.; CAVALLA, D.; PIRMOHAMED, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2019. DOI: 10.1038/nrd.2018.168.

RAMAMOORTHY, H.; ABRAHAM, P.; ISAAC, B. Melatonin protects against tenofovir-induced nephrotoxicity in rats by targeting multiple cellular pathways. *Human & Experimental Toxicology*, v. 40, n. 5, p. 826–850, 2021. DOI: 10.1177/0960327120968860.

RENGA, B.; MENCARELLI, A.; CIPRIANI, S.; D'AMORE, C.; FRANCISCI, D.; SANTUCCI, L.; BALDELLI, F.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S. In vivo administration of ritonavir worsens intestinal damage caused by cyclooxygenase inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, v. 723, p. 194–201, 2014. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.11.035.

RIVA, L.; YUAN, S.; YIN, X.; MARTIN-SANCHO, L.; MATSUNAGA, N.; PACHE, L.; BURGSTALLER-MUEHLBACHER, S.; DE JESUS, P. D.; TERIETE, P.; HULL, M. V.; CHANG, M. W.; CHAN, J. F.; CAO, J.; POON, V. K.; HERBERT, K. M.; CHENG, K.; NGUYEN, T. H.; RUBANOV, A.; PU, Y.; NGUYEN, C.; et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*, v. 586, n. 7827, p. 113–119, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2577-1.

SADASIVAM, N.; KIM, Y. J.; RADHAKRISHNAN, K.; KIM, D. K. Oxidative stress, genomic integrity, and liver diseases. *Molecules*, v. 27, n. 10, p. 3159, 2022. DOI: 10.3390/molecules27103159.

SHAIBI, T.; BALUG, H. N.; BEN-OTHTMAN, M. E.; BENJAMA, A. E.; ELHENSHERI, M.; LWALEED, B. A.; AL-GRIW, M. A. Exposure to low-dose bisphenol A induces spleen damage in a murine model: potentially through oxidative stress?. *Open Veterinary Journal*, v. 12, n. 1, p. 23–32, 2022. DOI: 10.5455/OVJ.2022.v12.i1.4.

TANBEK, K.; SANDAL, S. Dose-dependent oxidative damage of molnupiravir (antiviral drug for treatment of COVID-19) in lung, liver, heart, and kidney tissues in rats. *Archives of Pharmacology and Therapy*, v. 5, n. 1, p. 44–52, 2023.

TERCIOLO C, BRACARENSE AP, SOUTO PCMC, COSSALTER AM, DOPAVOGUI L, LOISEAU N, OLIVEIRA CAF, PINTON P, OSWALD IP. Fumonisin at Doses below EU Regulatory Limits Induce Histological Alterations in Piglets. *Toxins (Basel)*. 2019 Sep 19;11(9):548. doi: 10.3390/toxins11090548.

TODA, I, M; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M; DÍAZ-DEL CERRO, E; VALERA, G; CARRACEDO, G; GUERRA-PÉREZ, N. Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, Volume 211, 2023.

VILLANUEVA-PAZ, M.; MORÁN, L.; LÓPEZ-ALCÁNTARA, N.; et al. Oxidative stress in drug-induced liver injury (DILI): from mechanisms to biomarkers for use in clinical practice. *Antioxidants*, v. 10, n. 3, p. 390, 2021. DOI: 10.3390/antiox10030390.

WAN, M. L. Y.; TURNER, P. C.; CO, V. A.; et al. Schisandrin A protects intestinal

epithelial cells from deoxynivalenol-induced cytotoxicity, oxidative damage and inflammation. *Scientific Reports*, v. 9, p. 19173, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-55821-4.

WANG, G.; XIAO, B.; DENG, J.; GONG, L.; LI, Y.; LI, J.; ZHONG, Y. The role of cytochrome P450 enzymes in COVID-19 pathogenesis and therapy. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 791922, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2022.791922.

YANG, X.; CHEN, D.; LONG, H.; ZHU, B. The mechanisms of pathological extramedullary hematopoiesis in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, n. 14, p. 2723–2738, 2020. DOI: 10.1007/s00018-020-03450-w.

YANG, X.; et al. The mechanisms of pathological extramedullary haematopoiesis. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 11, p. 1036, 2020.

YOMBI, J.; POZNIAK, A.; BOFFITO, M.; JONES, R.; KHOO, S.; LEVY, J.; POST, F. A. Antiretrovirals and the kidney in current clinical practice: renal pharmacokinetics, alterations of renal function and renal toxicity. *AIDS*, v. 28, n. 5, p. 621–632, 2014. DOI: 10.1097/QAD.000000000000103.

ZATTI, P. H.; FERLITO, J. V.; DOS SANTOS BRANCO, C. Study of the role of oxidative stress and antioxidants in SARS-CoV-2 infection: a systematic review. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 8, p. 31346, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v11i8.31346.

ZERVOPOULOU, E.; GRIGORIOU, M.; DOUMAS, S. A.; YIANNAKOU, D.; PAVLIDIS, P.; GASPARDONI, G.; WALTER, J.; FILIA, A.; GAKIOPOULOU, H.; BANOS, A.; MITROULIS, I.; BOUMPAS, D. T. Enhanced medullary and extramedullary granulopoiesis sustain the inflammatory response in lupus nephritis. *Lupus Science & Medicine*, v. 11, n. 1, p. e001110, 2024. DOI: 10.1136/lupus-2023-001110.

ZHANG, Y.; TIAN, J.; WANG, C.; WU, T.; YI, D.; WANG, L.; ZHAO, D.; HOU, Y. N-Acetylcysteine administration improves the redox and functional gene expression levels in spleen, mesenteric lymph node and gastrocnemius muscle in piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Animals*, v. 13, n. 2, p. 262, 2023. DOI: 10.3390/ani13020262.

ZHAO, M.; MA, J.; LI, M.; et al. Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 23, p. 12808, 2021. DOI: 10.3390/ijms222312808.

ZHOU, H. HIV protease inhibitors induce endoplasmic reticulum stress and disrupt barrier integrity in intestinal epithelial cells. *Methods in Enzymology*, v. 490, p. 107–119, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00006-4.