

GABRIELA LISBOA E SOUZA

Estabelecimento de modelo in vitro para avaliação da infecção  
e ativação de células de endotélio microvascular cerebral  
humano por SARS-CoV-2



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
2023**

**Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Luciana Barros de Arruda e co-orientação de Sharton Vinícius Antunes Coelho**

## CIP - Catalogação na Publicação

S769e Souza, Gabriela Lisboa  
Estabelecimento de modelo in vitro para avaliação da infecção e ativação de células de endotélio microvascular cerebral humano por SARS-CoV-2 / Gabriela Lisboa Souza. -- Rio de Janeiro, 2023. 59 f.

Orientadora: Luciana Barros Arruda.  
Coorientador: Sharton Vinicius Antunes Coelho.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. SARS-CoV-2. 2. HBMECs. 3. ACE-2. 4. Endotelite. I. Arruda, Luciana Barros, orient. II. Coelho, Sharton Vinicius Antunes, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): Gabriela Lisboa e Souza**

**DRE: 120039096**

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Leticia de A. M. Carneiro (Presidente)

Profa. Dra. Tatiana Domitrovic

Dr. Gustavo P. D. Silva

Profa. Dra. Juliana Echevarria N. de Lima (Suplente)

**Título da Monografia: "Estabelecimento de modelo *in vitro* para avaliação da infecção e ativação de células de endotélio microvascular cerebral humano por SARS-CoV-2"**

**Local: Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 30 de novembro de 2023 às 09:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 30 de NOVEMBRO de 2023

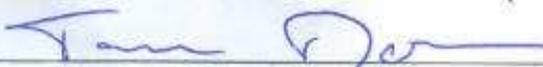
**NOTA:**

10,0

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Leticia de A. M. Carneiro (Presidente)

10

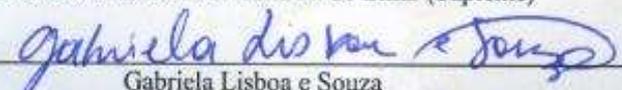
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Tatiana Domitrovic

10

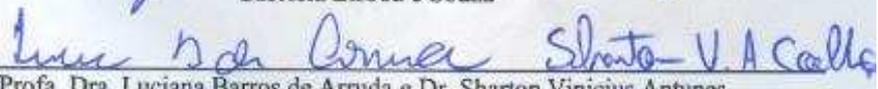
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo P. D. Silva

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Juliana Echevarria N. de Lima (Suplente)

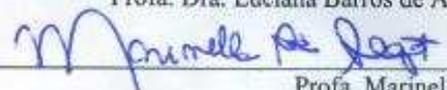
**Aluno(a):**

  
\_\_\_\_\_  
Gabriela Lisboa e Souza

**Orientador(a)  
(e coorientador):**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda e Dr. Sharton Vinicius Antunes

**Coordenadora de**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marinella Silva Laport

**TCC:**

*Dedico este trabalho a todas as mentes brilhantes que vieram antes de mim e trilharam o caminho para os avanços e descobertas de hoje, permitindo que eu explorasse o mundo enriquecido da ciência.*

*Com gratidão, estendo esta dedicação a todas as futuras gerações de pesquisadores que continuarão a expandir os horizontes da ciência com inovações e avanços ainda maiores.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha orientadora Prof. Dr. Luciana Barros de Arruda por ter me dado a oportunidade de aprender tanto com ela nos últimos dois anos e meio da minha graduação. Tudo que sei hoje sobre ciência, sobre pesquisa, sobre trabalho em grupo, sobre pensamento crítico, aprendi com ela. Gostaria de agradecer também ao Dr. Sharton Vinícius Coelho por ter me co-orientado e ensinado, de fato, tudo que sei hoje. Obrigada pelo aprendizado diário, por nunca ter me deixado na mão e por tudo que teve que me ensinar mais de uma vez, pois não anotei e me esqueci. Do LaGIIVir, gostaria de agradecer à Isadora Alonso pela participação neste projeto e por toda ajuda e parceria no dia-a-dia no laboratório. Também gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório, Lana e Bruno, que me agregaram conhecimento e foram muito companheiros nos últimos anos. Um agradecimento especial ao Luan, que além de colega de laboratório, se tornou um grande amigo com quem sempre pude contar quando precisei, seja dentro ou fora do laboratório, com quem sempre pude desabafar e sempre me aconselhou, obrigada por tudo. Agradeço também a todo o grupo da professora Luciana Costa por toda troca diária e apoio. No âmbito acadêmico, gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes pela excelência no ensino, pesquisa e contribuição à ciência. Às agências de fomento, CNPq, FAPERJ, agradeço por financiar e incentivar a ciência no Brasil.

Gostaria de agradecer à minha família, aos meus pais, aos meus avós e, principalmente, à minha mãe. Mãe, obrigada por ter me dado a oportunidade de estar aqui hoje me formando na maior Universidade Federal do Brasil. Obrigada por ter me dado a educação que me deu, por ter trabalhado tão duro sempre, para que eu pudesse focar nos meus estudos. Obrigada por ter me ensinado o valor da educação e dos estudos. Se cheguei onde estou hoje, é graças à você. Gostaria de agradecer aos meus amigos de fora da universidade que passaram os últimos quatro anos me incentivando, admirando e me apoiando para que pudesse chegar aqui hoje. Obrigada Giovanna e Sofia. Obrigada Sofia Piscitelli por ter me acompanhado em cada etapa dessa jornada. Obrigada Rafael por todo apoio e compreensão. Obrigada Bruna, Luana, Bárbara e Yasmin, por todas as noites em que me ouviram desabafar sobre a faculdade. Vocês também foram essenciais para que eu finalizasse essa graduação.

O meu maior agradecimento vai para os meus amigos que fiz dentro da universidade. Ao Gabriel, por toda Biologia Molecular que me ensinou nas vésperas das provas. À Mariana, pela amizade incrível que construímos na faculdade, por todos os conselhos e apoio ao longo dos anos. À Letícia, por toda a parceria, bons momentos e trocas sinceras. À Lívia, por todas as

risadas diárias, conviver com você foi um presente divino. À Virgínia, uma grande amiga que fiz no fim da graduação, agradeço por sempre me colocar pra cima e pelos momentos maravilhosos que compartilhamos. Por último, à Fabiane, que não só foi minha companheira de laboratório ao longo dos últimos 2 anos, mas que também foi essencial para tornar meus dias mais leves e foi uma grande amizade que construí na faculdade, obrigada por todos os dias. Obrigada a todos vocês pelo companheirismo, pelo grupo magnífico que formamos, por todos os almoços na copa da virologia, por todas as risadas e momentos alegres. Graças a vocês, lembrarei da época da faculdade com muito carinho. À vocês, meus amigos, eu dedico tudo o que eu conquistar daqui para frente, pois sem vocês, jamais teria chegado onde estou. Vocês tornaram minha rotina mais leve, meus dias mais felizes e meus piores dias, mais suportáveis. Foi uma honra acompanhar a jornada de cada um de vocês até esse momento tão esperado. Obrigada por tanto.

**GABRIELA LISBOA E SOUZA**

**ESTABELECIMENTO DE MODELO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DA  
INFECÇÃO E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DE ENDOTÉLIO MICROVASCULAR  
CEREBRAL HUMANO POR SARS-CoV-2**

**Orientador: Luciana Barros de Arruda**

**Co-orientador: Sharton Vinícius Coelho Antunes**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A COVID-19, causada pela infecção do SARS-CoV-2, é caracterizada por lesão pulmonar, com infiltração alveolar de células imunes, aumento dos níveis circulantes de citocinas como IL-6 e TNF, e por síndrome pró-trombogênica. A ativação de células endoteliais associado a evidências histopatológicas de endotelite, tem sido sugerida como um dos eventos associados ao aumento da resposta inflamatória resultando em edema alveolar e infiltrado celular no pulmão. Entretanto, a infecção produtiva de células endoteliais por SARS-CoV-2 ainda é controversa. Embora tenha sido demonstrado a presença de antígenos virais em células endoteliais de diferentes tecidos, tanto em análises post mortem, quanto em modelos *in vitro*, nenhum desses trabalhos demonstrou se o ciclo replicativo é completo e se ocorre a liberação de partículas virais infecciosas. Nosso grupo investiga há mais de dez anos o efeito da replicação de diferentes vírus sobre a ativação e permeabilidade de células endoteliais e, no presente trabalho, avaliamos se a linhagem de endotélio microvascular cerebral humano (HBMECs) são susceptíveis e permissivas ao SARS-CoV-2 e se a infecção impacta a fisiologia dessas células. Inicialmente, avaliamos a expressão do receptor viral ACE-2 e da molécula CD147, também descrita como receptor alternativo para entrada do vírus. Observamos que HBMECs expressam baixos níveis de ACE-2, mas níveis semelhantes de CD147 em relação a outros modelos celulares já bem caracterizados de replicação viral. Além disso, não detectamos a presença de partículas virais infecciosas no sobrenadante das células sugerindo que as HBMECs não são produtivamente infectadas. A partir desses resultados hipotetizamos que a baixa expressão de ACE-2 na superfície dessas células estaria impactando na sua capacidade de replicação do SARS-CoV-2. Para investigar essa hipótese, nosso grupo construiu um vetor lentiviral carreando a sequência de ACE-2 humana (denominado P-ACE-2), e o mesmo foi utilizado como ferramenta para induzir a superexpressão de ACE-2 em HBMECs. Observamos que a nossa ferramenta foi capaz de transduzir de forma eficiente o mRNA da ACE-2 humana nas HBMECs, promovendo o aumento da expressão proteica na superfície das células. Foi realizada uma cinética da viabilidade das HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 em paralelo à análise da expressão de ACE-2 nas mesmas condições para definirmos a concentração de uso ideal que não provocasse a queda da viabilidade das HBMECs, mas que ainda fosse suficiente para promover a superexpressão de ACE-2 nas células. Após a padronização do pseudovírus, com a superexpressão do receptor de entrada do vírus,

observamos que as HBMECs passaram a ser permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2, demonstrado pelo aumento da expressão de RNA genômico intracelular, subgenômico e liberação de partículas infecciosas no sobrenadante, quando comparados às células que não superexpressam ACE-2. Por fim, observamos que a infecção viral induziu aumento da expressão de transcritos de IL-8 HBMECs superexpressando ou não ACE-2, sugerindo que a ativação das células independe da superexpressão de ACE-2. Em conjunto, nossos resultados demonstram que esse modelo pode ser utilizado como ferramenta para compreender o perfil de ativação das células endoteliais infectadas pelo vírus e quais as suas consequências.

Palavras-chaves: HBMEC; SARS-CoV-2; ACE-2; Pseudovírus

**GABRIELA LISBOA E SOUZA**

**ESTABLISHMENT OF AN IN VITRO MODEL TO EVALUATE HUMAN BRAIN  
MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS INFECTION AND ACTIVATION BY  
SARS-CoV-2**

**Orientador: Luciana Barros de Arruda**

**Co-orientador: Sharton Vinícius Coelho Antunes**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

COVID-19, caused by SARS-CoV-2 infection, is characterized by lung injury with alveolar infiltration of immune cells, increased circulating levels of cytokines like IL-6 and TNF, and a prothrombotic syndrome. Activation of endothelial cells, with histological evidence of endothelitis, has been suggested as one of the events associated with the increased inflammatory response, resulting in alveolar edema and cellular infiltrate in the lungs. However, the productive infection of endothelial cells by SARS-CoV-2 is still controversial. Although the presence of viral antigens in endothelial cells of different tissues has been demonstrated, both in post-mortem analyses and *in vitro* models, none of these studies have shown whether the replicative cycle is complete and results in the release of infectious viral particles. For many years, our group has been investigating the effect of the replication of different viruses on the activation and permeability of endothelial cells. In the present study, we assessed whether human cerebral microvascular endothelial cells (HBMECs) are susceptible to SARS-CoV-2 infection and if the infection impacts the physiology of these cells. Initially, we evaluated the expression of the main viral receptor ACE-2 and the molecule CD147, also described as a potential receptor for SARS-CoV-2. We observed that HBMECs express low levels of ACE2 but similar levels of CD147 compared to well-characterized models of viral replication. However, viral titration assays did not detect infectious particles in the medium, indicating that the virus's replicative cycle is not completed. We hypothesized that the low availability of ACE-2 in HBMECs might be influencing the infectious capacity of SARS-CoV-2. To overcome this problem, we constructed a lentiviral vector carrying human ACE-2 (pseudovirus - P-ACE-2) to transduce this protein into the cells. Transduction of P-ACE-2 in HBMECs increased the expression of enzymatically active ACE2. P-ACE2-transduced HBMECs were permissive to SARS-CoV-2 infection, as evidenced by increased intracellular genomic and subgenomic RNA, and by the release of infectious particles. Furthermore, SARS-CoV-2 infection induced an increased expression of IL-8 mRNA in cells overexpressing or not ACE-2, suggesting that cell activation was not dependent on ACE-2 expression. Together, our results demonstrate that this model can be used as a tool to understand the activation profile of endothelial cells infected by the virus and its consequences.

Key-words: HBMEC; SARS-CoV-2; ACE-2; Pseudovirus

**GABRIELA LISBOA E SOUZA**

**ESTABELECIMENTO DE MODELO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DA  
INFECÇÃO E ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DE ENDOTÉLIO MICROVASCULAR  
CEREBRAL HUMANO POR SARS-CoV-2**

**Orientador: Luciana Barros de Arruda**

**Co-orientador: Sharton Vinícius Coelho Antunes**

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A COVID-19, causada pela infecção do vírus SARS-CoV-2, causa danos nos pulmões, além de inflamação e problemas na coagulação sanguínea. Nosso estudo foca em compreender o papel de células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos de todo o corpo e apresentam papel muito importante em manter o equilíbrio do organismo, no agravamento da COVID-19. Para isso, precisamos entender se o vírus pode infectá-las e alterar o seu funcionamento. Descobrimos que essas células têm baixos níveis do receptor viral chamado ACE-2, o qual é utilizado pelo SARS-CoV-2 para infectar as células do corpo. Além disso, também apresentam outro receptor, o CD147. No entanto, as células não são eficientemente infectadas pelo vírus. Para superar isso, criamos um vetor chamado pseudovírus (P-ACE-2) que tem a capacidade de aumentar a quantidade de ACE-2 nas células. Descobrimos que altas concentrações desse vetor podem ser tóxicas para as células e que ao longo do tempo, mesmo após fornecermos esse receptor pras células através do P-ACE-2, a presença dele vai diminuindo. Ainda sim, observamos que, com a presença de ACE-2 nas células, elas passaram a ser infectadas pelo SARS-CoV-2, mostrando aumento do material genético viral e liberação de partículas infecciosas. Além disso, descobrimos que a presença do vírus (variantes RJ1 e ômicron) aumenta a expressão de uma substância inflamatória chamada IL-8 nas células, independentemente da presença do ACE-2. Isso sugere que as células endoteliais respondem à presença do vírus, e nosso modelo pode ajudar a entender como essas células reagem à infecção pelo SARS-CoV-2 e suas consequências no funcionamento do corpo para o agravamento da doença.

### LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACE-2</b>	Do inglês: “Angiotensin converting enzyme II”
<b>Arg</b>	Arginina
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>BALD</b>	Fluido de lavado broncoalveolar - do inglês “Bronchoalveolar lavage fluid”
<b>CCL-</b>	Ligante de quimiocina com motivo CC - do inglês “Chemokine (C-C motif) ligand”
<b>CDC</b>	Centro de prevenção e controle de doenças - do inglês “Center for Disease Control and Prevention”
<b>CE</b>	Células endoteliais
<b>CG</b>	Complexo de Golgi
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulose
<b>COVID-19</b>	Doença do coronavírus 2019 – do inglês “Coronavirus disease of 2019”
<b>CT</b>	ciclo threshold
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	do inglês “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
<b>E</b>	Envelope
<b>EP</b>	Embolia Pulmonar
<b>FMS</b>	Fenazina metasulfato
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>HAE</b>	Angioedema hereditário - do inglês “Hereditary angioedema”
<b>HBMECs</b>	Células endoteliais da microvasculatura cerebral humana - do inglês “Human Brain Microvascular Endothelial Cells”
<b>HEK 293</b>	Células de rim de embrião humano - do inglês “Human Embryonic Kidney”
<b>ICTV</b>	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
<b>IFN-</b>	Interferon
<b>IL-</b>	Interleucina

<b>IP</b>	Inibidor de protease
<b>LDH</b>	lactato-desidrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	Membrana
<b>MERS</b>	Síndrome respiratória do Oriente Médio - do inglês “Middle East respiratory syndrome”
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção - do inglês “Multiplicity of infection”
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro – do inglês “messenger RNA”
<b>NAD</b>	difosfopirido nucleótido
<b>NB3</b>	Nível de Biossegurança 3
<b>NF- <math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B - do inglês “Nuclear factor kappa B”
<b>NO</b>	Do inglês “Nitric oxide”
<b>NSPs</b>	Proteínas não-estruturais - do inglês “Non structural proteins”
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ON</b>	Do inglês: “Overnight”
<b>ORF</b>	Do inglês: “Open reading frame”
<b>P-ACE-2</b>	pseudovírus carregando o mRNA de ACE-2 humana
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida - do inglês “Polyacrylamide gel electrophoresis”
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino - do inglês “Phosphate-saline buffer”
<b>proteína S</b>	Proteína de espícula – do inglês “spike”
<b>RAAS</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona - do inglês “Renin-angiotensin-aldosterone system”
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RLU</b>	Unidades Relativas de Luminescência - do inglês “Relative Units of Luminescence”
<b>RNAdf</b>	RNA de dupla fita
<b>RNAg</b>	RNA genômico
<b>RNAsg</b>	RNA subgenômico

<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase associada a transcrição reversa – do inglês “Rever transcription-polymerase chain reaction”
<b>SARS</b>	Síndrome respiratória aguda grave - do inglês “Severe acute respiratory syndrome”
<b>SARS-CoV-2</b>	Do inglês “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2”
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TBS</b>	Solução salina tamponada com Tris - do inglês “Tris-buffered saline”
<b>TLR</b>	Do inglês: “toll like receptor”
<b>TMPRSS2</b>	Serino protease transmembranar celular - do inglês “Transmembrane serine protease 2”
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral – do inglês “Tumor necrosis factor”
<b>TRSs</b>	Sequências regulatórias de transcrição - do inglês “Transcription regulatory sequences”
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>VERO</b>	Células de rim de macaco verde africano - do inglês “African green monkey kidney cells”
<b>β-Cov</b>	<i>Betacoronavírus</i>

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	Iv
RESUMO .....	Viii
ABSTRACT .....	X
RESUMO PARA LEIGOS .....	Xi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Histórico: SARS-CoV e MERS-CoV.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.3 Características gerais do SARS-CoV-2.....	3
1.4 Patogênese e manifestações clínicas .....	6
1.5 Células Endoteliais .....	8
1.6 Papel das células endoteliais na infecção do SARS-CoV-2 .....	9
2 JUSTIFICATIVA.....	10
3 OBJETIVOS .....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
4.1 Linhagens celulares .....	11
4.2 Vírus .....	12
4.3 Propagação de SARS-CoV-2 .....	12
4.4 Construção de pseudovírus e transfecção in vitro de células HEK293-T .....	13
4.5 Estimulação de HBMEC in vitro com pseudovírus .....	14
4.6 Ensaio de Luciferase .....	14
4.7 Infecção e estimulação de HBMECs in vitro com SARS-CoV-2 .....	15
4.8 Titulação de SARS-CoV-2 por ensaio de plaque .....	15
4.9 Avaliação da expressão proteica de receptores de SARS-CoV-2, ACE-2 e CD147 e da proteína N viral por western blotting .....	16
4.10 Avaliação da replicação viral, da expressão de mediadores inflamatórios e de ACE-2 por RT-q PCR .....	17
4.11 Viabilidade Celular .....	19
4.12 Análises estatísticas .....	20
5. RESULTADOS .....	20
5.1 HBMECs são suscetíveis, mas não permissivas a replicação de SARS-CoV-2 in vitro .....	20
5.2 A pré estimulação de HBMECs com estímulos inflamatórios não afeta a suscetibilidade e a permissividade das células à infecção pelo SARS-CoV-2 .....	23
5.3 Construção de P-ACE-2 para a indução da superexpressão de ACE-2 em HBMECS .....	25
5.4 Cinética da expressão de ACE-2 e da viabilidade das HBMECs infectadas com P-ACE-2 .....	27
5.5 Análise da infecção de SARS-CoV-2 em HBMECs superexpressando ACE-2..	29
5.6 Análise da ativação de HBMECs superexpressando ACE-2 e infectadas com SARS-CoV-2.....	31
6. DISCUSSÃO .....	32
7. CONCLUSÃO .....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico: SARS-CoV e MERS-CoV

No início dos anos 2000, ocorreu o surgimento do primeiro coronavírus de alto grau de relevância médica de origem zoonótica. Denominado de SARS-CoV e originário da China, a transmissão deste vírus para humanos ocorreu através do contato com civetas no mercado localizado na cidade de Shenzhen (Hui *et al.*, 2019). A alta densidade de pessoas circulando entre as províncias chinesas facilitou o espalhamento do vírus pelo país e, após meses e diversos casos observados desta doença até então desconhecida, finalmente, em 22 de Março de 2003, puderam identificar o patógeno e a Organização Mundial de Saúde (OMS) denominou a doença de Síndrome respiratória aguda grave (OMS, 2003; Hui *et al.*, 2019;). O SARS-CoV provocou uma epidemia, afetando mais de 29 países e regiões ao redor do globo, entretanto, não muito tempo depois, em julho do mesmo ano, a OMS declarou o fim da epidemia de SARS-CoV, totalizando mais de 8 mil casos e 700 mortes pela doença ( Hui *et al.*, 2020).

Na década seguinte, no ano de 2012, houve um novo surto causado por um coronavírus zoonótico que se originou da infecção de camelos. Descoberta no Oriente Médio, a doença denominada de Síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) é provocada pelo coronavírus causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (Azhar *et al.*, 2019). Apesar desse vírus ter se espalhado por aproximadamente 27 países e terem sido registrados casos de viajantes de fora do Oriente Médio, até os dias atuais ela é considerada endêmica da Península Arábica. Além disso, a alta taxa de mortalidade apresentada na doença, podendo chegar a 35% de mortalidade, pode estar relacionada com a menor transmissibilidade do vírus entre humanos (OMS, 2015).

No final de dezembro de 2019, o terceiro coronavírus (CoV) de origem zoonótica reportado neste século surgiu na cidade de Wuhan, na China (Gralinski *et al.*, 2020). Denominado de coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), esse vírus se demonstrou mais infeccioso do que ambos os SARS-CoV e MERS-CoV. Os três vírus são conhecidos por causarem sintomas de pneumonia viral, incluindo febre, dificuldade de respirar e infiltração pulmonar em casos mais severos (Gralinski *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Entretanto, o novo coronavírus demonstrou ser transmissível em portadores assintomáticos e pré-sintomáticos, sendo mais facilmente

disseminado entre humanos, quando comparado aos outros dois vírus que apresentaram lento aumento do número de casos (Zhang & Holmes, 2020).

## **1.2. Epidemiologia do SARS-CoV-2**

A descoberta do novo coronavírus foi marcada por uma série de indivíduos buscando atendimento médico apresentando sintomas de pneumonia viral provocada por agente etiológico desconhecido, tendo sido relatados desde casos leves e moderados com sintomas clássicos de tosse seca, coriza e febre, até casos mais graves, envolvendo infiltração de líquidos para os pulmões e dispnéia (Zhu *et al.*, 2020). Investigações epidemiológicas a respeito da origem da fonte de contaminação mostraram que diversos pacientes acometidos pelo novo coronavírus frequentaram e/ou tiveram contato com pessoas que frequentavam o Mercado de Wuhan, onde eram vendidos frutos do mar, aves e animais selvagens ainda vivos ou recém mortos (Deng & Peng, 2020). Posteriormente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou a possibilidade de uma infecção zoonótica e, em janeiro de 2020, foi a público a identificação etiológica do novo coronavírus (Gralinski & Manachery, 2020). Referia-se a um novo betacoronavírus que pôde ser isolado e ter o RNA sequenciado a partir de amostra de lavado broncoalveolar de um paciente e subsequentemente verificado em 16 outros pacientes (Gralinsky *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

O rápido espalhamento do vírus pela população na China e viajantes estrangeiros, demonstrou sustentação da transmissão viral entre humanos (Chan *et al.*, 2020; Deng & Peng., 2020). O aumento no número de casos ao redor do globo provocou preocupação internacional e, em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou emergência de saúde pública de interesse internacional (OMS, 2020). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) nomeou o vírus de SARS-CoV-2 e a doença foi nomeada pela OMS como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (ICTV, 2020; OMS, 2020)

Rapidamente foram implementadas medidas para combater o espalhamento do vírus, entretanto, a transmissão facilitada pelo contato próximo, permitiu a disseminação do SARS-CoV-2 para todos os continentes (revisado por Fisher & Heymann, 2020). Assim, no dia 11 de março de 2020, a OMS declarou pandemia de COVID-19, havendo mais de 500 mil casos confirmados no mundo inteiro no fim daquele mês (OMS, 2020).

Até o dia 10 de março de 2023, foram registrados 676 milhões de casos da doença e mais de 6,8 milhões de mortes no mundo inteiro causadas pelo SARS-CoV-2

(<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). No Brasil apenas, foram registrados mais de 37 milhões de casos e 700 mil mortes no país, como mostrado na figura 1 (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Entretanto, o aumento do número de indivíduos imunizados contra o SARS-CoV-2 promoveu o declínio nas hospitalizações e internações em unidades de terapia intensiva (UTI) relacionadas à doença e tendência de queda nas mortes por COVID-19 (OPAS, 2023). Assim, no dia 05 de maio de 2023, foi declarado o fim da emergência de saúde pública de Importância Internacional, ainda que continue sendo uma ameaça à saúde pública (OMS, 2023).



**Figura 1: Painel da COVID-19 no Brasil.** Painel dos números de casos de infecção, morte e vacinação no Brasil até o dia 10/03/2023 extraídos do Johns Hopkins University (acessado em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>)

### 1.3. Características gerais do SARS-CoV-2

Assim como SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 também pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *betacoronavirus* ( $\beta$ -CoV) (revisado por Gorbalenya *et al.*, 2020). Análises genômicas e filogenéticas demonstraram que o novo coronavírus apresenta mais de 70% de similaridade na sequência genômica com o SARS-CoV e aproximadamente 50% com o MERS-CoV (Zhang & Holmes, 2020). O SARS-CoV-2 possui 30kb de genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva não segmentado, no qual codifica para 20 proteínas, sendo 16 não-estruturais (NSPs) com papel de regulação da replicação e patogênese viral, além de 4 proteínas estruturais que são denominadas de nucleocapsídeo (N), envelope (E), membrana (M) e na superfície do envelope, a glicoproteína de espícula (S). (Lu *et al.*, 2020; Zhang & Holmes, 2020).

A principal proteína determinante do tropismo do SARS-CoV-2 é a proteína S, a qual é utilizada para iniciar a infecção na célula hospedeira pelo processo de adsorção

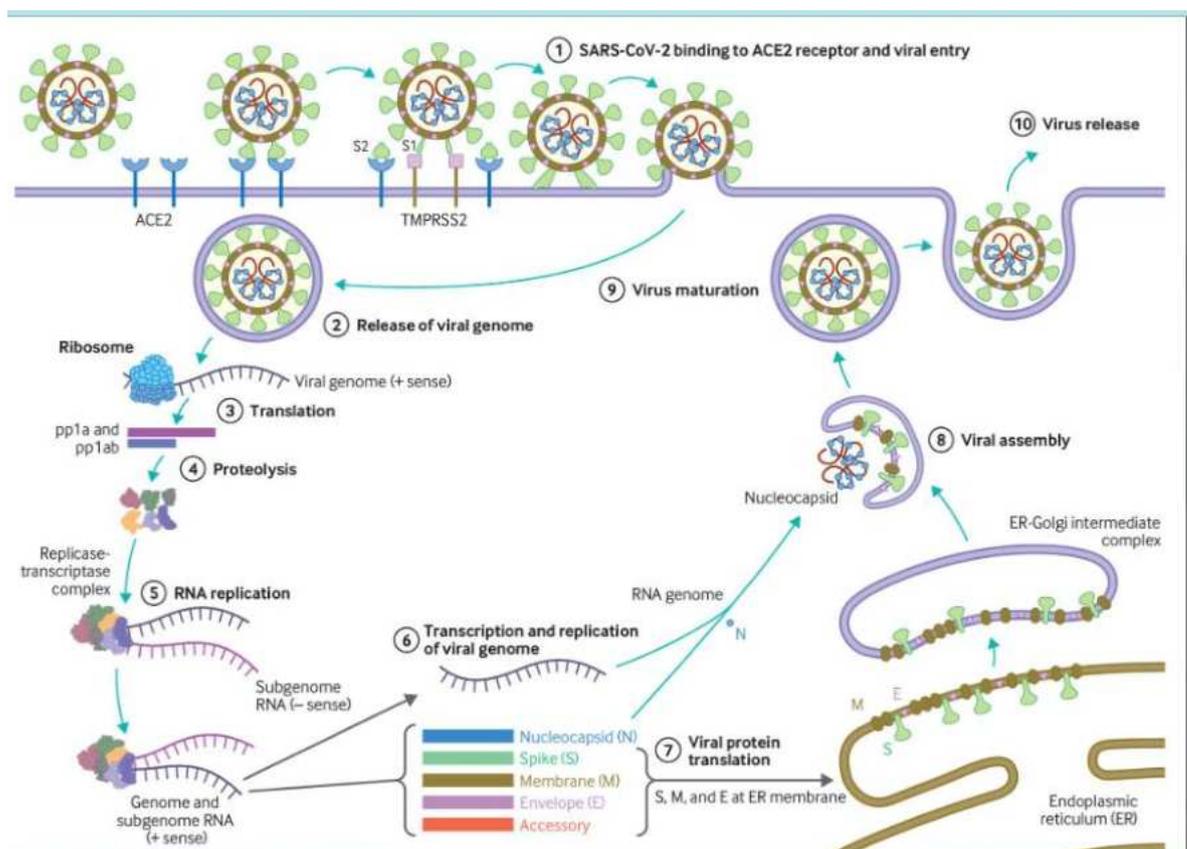
viral, a partir da ligação com o seu receptor de superfície celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) (Hoffmann *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Essa interação inicial ocorre através do domínio S1 da proteína S, que contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), e facilita a ligação viral à superfície das células-alvo (Hoffmann *et al.*, 2020). Além disso, permite que a serino protease transmembranar celular (TMPRSS2) clive os domínios S1 e S2 da proteína S, fazendo com que o domínio S2 promova a fusão do envelope viral com a membrana celular para entrada do vírus na célula (Hoffmann *et al.*, 2020). Outro possível caminho da entrada do vírus se dá através de vias endocíticas, em que proteases celulares, como as catepsinas B e L (Gierer *et al.*, 2013), são ativadas por conta da mudança de pH dentro do endossoma e clivam os domínios S1 e S2 da proteína S viral, permitindo a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma (Hoffmann *et al.*, 2020). Já foi descrito que a entrada do vírus nas células hospedeiras também pode ser mediada por outras moléculas alternativas, como a CD147, uma glicoproteína transmembranar pertencente à família das imunoglobulinas expressa por diversos tipos celulares, incluindo células do trato respiratório (Wang *et al.*, 2020; Amraei *et al.*, 2021).

A etapa que sucede a entrada do vírus na célula é o desnudamento do material genético. Por ser de RNA de fita simples e polaridade positiva, o material genético do SARS-CoV-2 está sujeito à tradução imediata, sendo rapidamente reconhecido pelos ribossomos da célula para dar início à produção das proteínas virais (revisado por V'kovski *et al.*, 2021). A tradução de duas ORFs presentes no genoma viral (ORF1a e ORF1b) produz duas poliproteínas, pp1a e pp1b, respectivamente. A partir da clivagem das poliproteínas, são formadas as 16 proteínas não estruturais (NSPs) que, após sintetizadas em quantidades adequadas, formarão o complexo replicase e irá se iniciar o processo de replicação do genoma do SARS-CoV-2 (revisado por V'kovski *et al.*, 2021)

A partir do molde do RNA viral, é feita a síntese de uma fita complementar de RNA de polaridade negativa, formando um RNA intermediário de replicação de dupla fita (RNA<sub>df</sub>). Então, utilizando a fita de RNA de polaridade negativa como molde, novas fitas de RNA positivo são sintetizadas, que poderão ser utilizadas para um novo processo de tradução das proteínas virais ou poderão compor o genoma das novas partículas virais a serem montadas (revisado por Perlman & Netland, 2009; revisado por Gorbalenya *et al.*, 2006; revisado por V'kovski *et al.*, 2021).

Já a tradução das proteínas estruturais e acessórias acontece através da tradução de RNAs subgenômicos em um processo descontínuo de transcrição do genoma, sendo controlado pelas sequências regulatórias de transcrição (TRSs) presentes no genoma (Wu & Brian, 2010; Sawicki & Sawicki, 1995). O papel dos TRSs consiste em interromper o avanço do complexo de replicase na síntese do RNA de polaridade negativa, produzindo estruturas menores que servirão de molde para a formação de RNA positivo que, por sua vez, serão traduzidos em proteínas estruturais e acessórias (Wu & Brian, 2010; Sneijder *et al.*, 2006).

A próxima etapa do ciclo replicativo do SARS-CoV-2, todo representado na figura 2, é a montagem das novas partículas virais (Stertz *et al.*, 2007). Assim, as proteínas estruturais associadas à membrana do retículo endoplasmático (RE) e ao complexo de Golgi (CG), auxiliam na montagem dos vírions e incorporação dos genomas recém produzidos, dando ênfase a proteína M, que tem papel chave na montagem dos novos vírions, direcionando a formação do envelope viral e promovendo a matriz à qual o nucleocapsídeo irá se conectar (revisado por Haan & Rottier, 2005). Por fim, a gama de vírus formados é liberada da célula hospedeira por exocitose para infectar novas células e repetir o processo de disseminação (revisado por de Haan & Rottier, 2005; Stertz *et al.*, 2007).



**Figura 2: Ciclo replicativo do SARS-CoV-2.** A primeira etapa do ciclo replicativo do SARS-CoV-2 consiste na ligação e entrada do vírus na célula, processo esse que ocorre através da ligação da proteína de espícula (S) no seu receptor celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) expressa na superfície de células-alvo. Essa ligação, juntamente com a clivagem dos domínios S1 e S2 da proteína S, mediada pela serinoprotease TMPRSS2, permitem a fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira. Após entrar na célula, ocorre o desnudamento do material genético no citoplasma da célula, que será rapidamente reconhecido pela maquinaria de tradução celular, já que se trata de um RNA genômico de fita simples e polaridade positiva. Inicialmente, são traduzidas as proteínas não estruturais responsáveis pela formação do complexo de replicação, como a polimerase viral. Essas proteínas são produzidas na forma de poliproteínas que, posteriormente, sofrerão clivagem por proteases para a formação das proteínas maduras. Quando essas proteínas se encontram em quantidades suficientes, é iniciado o processo de replicação a partir do uso da fita parental do RNA genômico para produção de RNAs de polaridade negativa que, por sua vez, serão utilizados como moldes para síntese de novos RNAs genômicos (RNAg) e sub genômicos (RNAsg) de polaridade positiva. As fitas de RNAsg são geradas por processo descontínuo de replicação e serão utilizadas para um novo processo de tradução, agora das proteínas estruturais e acessórias do vírus. As proteínas de membrana (M), envelope (E) e espícula (S), recém sintetizadas, serão direcionadas ao retículo endoplasmático (RE) para o processo de montagem das novas partículas virais e, ao fim do processo, ocorre a maturação dos novos vírions produzidos que serão liberados da célula por exocitose.

#### 1.4. Patogênese e manifestações clínicas da COVID-19

A infecção por SARS-CoV-2 leva a COVID-19, relacionada principalmente a sintomas respiratórios (revisado por Cevik *et al.*, 2020). A transmissão do vírus se dá pelo contato direto ou indireto com gotículas respiratórias de indivíduos infectados (Liang *et al.*, 2020; revisado por Mukhra, Krishan & Kanchan, 2020). O vírus atinge o epitélio das vias aéreas superiores e dos tecidos da naso e orofaringe, podendo disseminar para o trato respiratório inferior e infectar células epiteliais alveolares, (Hamming *et al.*, 2004). A infecção apresenta incubação de 1-14 dias, sendo em média 5 a 6 dias para o início do aparecimento dos sintomas iniciais (Wu & McGoonan, 2020; Chan *et al.*, 2020; (Li *et al.*, 2020). O quadro inicial da doença está relacionado ao desenvolvimento de sintomas inespecíficos, como febre, mialgia, fadiga, dores de cabeça e sintomas respiratórios (Cevik *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

A distribuição do receptor ACE-2 em diferentes tecidos pode explicar o desenvolvimento de sintomas extrapulmonares, principalmente no sítio gastrointestinal - em que até 40% dos pacientes acometidos relataram vômito e diarreia - (Liang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Em quadros clínicos moderados, os indivíduos podem desenvolver sintomas menos comuns, como distúrbios de olfato e paladar, calafrios e náuseas. Já em casos mais severos, é comum o desenvolvimento de pneumonia, insuficiência respiratória, além de terem sido relatados alterações cardiovasculares, lesão hepática e danos neurológicos Huang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). Entretanto, os sintomas nesses sítios também podem ser explicados pelos efeitos da resposta

inflamatória exacerbada muito recorrente em casos mais graves (Wang & Perlman, 2020)

A resposta inflamatória provocada pelo reconhecimento viral através de sensores citoplasmáticos e endossomais, como MDA5 e TLRs, respectivamente, é essencial para o controlar a infecção (Thorne *et al.*, 2021; Manik & Singh, 2021). O disparo desses sensores está relacionado à ativação de cascatas de sinalização que culminam na expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o IFN do tipo I e III que apresenta importante papel antiviral de suprimir a replicação e disseminação do vírus no organismo (Wang & Perlman, 2020; Thorne *et al.*, 2021). Além disso, junto com outras citocinas e quimiocinas secretadas, apresentam papel de coordenar a ativação e atuação da imunidade adaptativa no combate à infecção. (Thorne *et al.*, 2021; Manik & Singh, 2021). Entretanto, a desregulação da resposta imunológica pode provocar o excesso de células imunes (macrófagos e neutrófilos), e mediadores inflamatórios (IL-8 e CCL2) no sítio de infecção (Del Valle *et al.*, 2020; Magro, 2020). Diversos estudos também têm correlacionado altas concentrações de IL-6 e IFN com a gravidade da doença (Gong *et al.*, 2020). Essa superprodução de mediadores pró-inflamatórios no contexto de infecção que acarreta no desenvolvimento de manifestações graves é denominada de “tempestade de citocinas” e têm sido relacionada ao desenvolvimento de imunopatologias, danos graves, principalmente nos pulmões, e óbito de pacientes com COVID-19 grave (Del Valle *et al.*, 2020; Wang & Perlman, 2020).

Disfunções hemostáticas também estão associadas a casos severos da COVID-19, como o desenvolvimento de coagulopatias que podem resultar em embolia pulmonar e óbito do paciente (Klok *et al.*, 2020). Essas disfunções podem estar associadas tanto à inflamação exacerbada, quanto à ativação plaquetária e disfunção endotelial provocadas pela infecção do SARS-CoV-2, gerando quadros trombogênicos. (Levi *et al.*, 2020). De fato foi observado que disfunções endoteliais da microvasculatura pulmonar podem contribuir para o desenvolvimento de microtrombos localizados ou sistêmicos. (Ackermann *et al.*, 2020) Por isso, diversos estudos têm sugerido que a perda de integridade do endotélio na COVID-19, junto com a exposição à fatores pró-trombogênicos, está associado à desregulação hemostática, disparando cascatas de coagulação que culminam na formação de coágulos (Wichmann *et al.*, 2020). Os coágulos, quando formados nos pulmões, podem prejudicar a passagem de sangue no órgão e provocar disfunção respiratória (Ackermann *et al.*, 2020).

### 1.5. Células Endoteliais

As células endoteliais (CEs) revestem as paredes internas dos vasos sanguíneos de todos os tecidos do corpo humano e formam uma interface sangue-tecido com função primária essencial de regular a permeabilidade da parede do vaso. Entretanto, essas células também estão envolvidas em diversos processos fisiológicos importantes no organismo, como o controle da pressão sanguínea, apresentando importante capacidade de liberação de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador (Cines *et al.*, 1998). Ademais, as CEs apresentam função de facilitar o fluxo sanguíneo por possuir superfície que, em condições fisiológicas normais, apresenta característica antitrombótica, inibindo adesão plaquetária e a formação de coágulos (Cines *et al.*, 1998). Ainda assim, quando ocorrem distúrbios homeostáticos, o endotélio vascular rapidamente sofre alterações bioquímicas que reprogramam seu funcionamento, passando a apresentar superfície pró-trombótica e, assim, podendo contribuir para o avanço de patologias (Libby & Lüscher., 2020; Hattori *et al.*, 2022).

Em situações de inflamação, as células endoteliais desempenham um papel crucial, respondendo aos estímulos de mediadores inflamatórios, como IL-6 e IL-8, que são liberados por células imunes ativadas (Cines *et al.*, 1998). Elas facilitam a migração de leucócitos para os locais de inflamação ao aumentarem a permeabilidade vascular, permitindo a passagem de células imunes circulantes para o tecido adjacente (Cines *et al.*, 1998; Fosse *et al.*, 2021). No entanto, em um cenário de liberação excessiva de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, uma inflamação descontrolada, as células endoteliais podem não apenas intensificar ainda mais a liberação de citocinas e quimiocinas, contribuindo pro agravamento da inflamação, mas também pode ocorrer a perda de sua integridade, levando ao extravasamento de líquidos e células para os tecidos de forma descontrolada (Jin *et al.*, 2020).

Já em um contexto infeccioso, a ativação de CEs pode ocorrer, tanto devido à ação de mediadores inflamatórios sobre as CEs, quanto devido à infecção direta pelo patógeno (Varga *et al.*, 2020). Alguns estudos já demonstraram que ativação de células endoteliais pulmonares durante a infecção pelo vírus Influenza é o principal evento relacionado ao recrutamento de células imunes inatas e à produção de citocinas e quimiocinas no início da infecção e que esses eventos estão relacionados com o aumento da morbidade na doença (Teijaro *et al.*, 2011). Em outras doenças, como na síndrome pulmonar causada pela infecção por hantavírus, autores relatam a presença de antígenos

virais na microvasculatura pulmonar e a associam com uma desregulação grave da permeabilidade vascular (Zaki *et al.*, 1995) Isso tudo em conjunto pode contribuir para a disfunção de células endoteliais, culminando na perda do balanço entre vasodilatação e vasoconstrição e, conseqüentemente, perda da característica anticoagulantes e antitrombóticas normais, podendo provocar distúrbios homeostáticos no organismo.

### **1.6. Papel de células endoteliais na infecção do SARS-CoV-2**

Muitas questões moleculares e celulares relacionadas à COVID-19 permanecem não respondidas, incluindo quais células são infectadas pelo SARS-CoV-2. Por ser uma doença majoritariamente com sintomas respiratórios, sabe-se que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar o trato respiratório superior e inferior, incluindo o epitélio alveolar (revisado por Cevik *et al.*, 2020). Entretanto, a infecção de células endoteliais de diversos tecidos permanece ainda controversa na literatura. Alguns autores demonstram que a ativação de CEs pode ocorrer de forma direta pela infecção dos vírus nas células, uma vez que alguns grupos de CEs podem expressar ACE-2 e serem alvo de infecção, já havendo sido relatado a presença de antígenos virais no interior de CEs (Hoffmann *et al.*, 2020; Pons *et al.*, 2020; Hamming *et al.*, 2020). Já foi demonstrado em análises post-mortem de pacientes de COVID-19 a presença do SARS-CoV-2 no interior de células endoteliais da microvasculatura cerebral (hBMECs) (Mondolfi *et al.*, 2020). Ainda, estudos com organóides vasculares humanos também sugeriram replicação viral pelo aumento da expressão de RNA viral ao longo tempo, embora a expressão especificamente nas células endoteliais não tenha sido investigada (Monteil *et al.*, 2020). Além disso, a liberação de partículas infecciosas em culturas de CE, bem como a presença de componentes não estruturais, confirmando replicação produtiva, no entanto, não foi demonstrada até o momento. De fato, não existem muitos trabalhos correlacionando diretamente a infecção do SARS-CoV-2 nas células endoteliais com o desenvolvimento de endotelite e, conseqüentemente, com o agravamento da COVID-19. Na literatura, muitos autores descrevem a ativação de CEs como uma consequência indireta da infecção pelo SARS-CoV-2, através da liberação de mediadores inflamatórios por células imunes ativadas durante a infecção (Pons *et al.*, 2020; Burgos *et al.*, 2021).

Dado o papel fundamental das células endoteliais em manter a homeostase e a permeabilidade vascular, a disfunção de CEs pode participar ativamente em processos trombo-inflamatórios e resultar em danos vasculares severos na COVID-19 (Pons *et al.*,

2020). Já foi demonstrado que a liberação de IL-6, TNF e IL-1 $\beta$ , mediadores comumente aumentados em pacientes com COVID-19, pode induzir a perda de função anti-trombótica e anti-inflamatória normal em células endoteliais, levando a desregulação da coagulação, ativação plaquetária, além do aumento da produção de mediadores inflamatórios, moléculas de adesão e permeabilidade vascular nessas células, induzindo o extravasamento vascular e infiltração de células imunes para os tecidos pulmonares. (Pons *et al.*, 2020; Desai *et al.*, 2002; revisado por Teuwen *et al.*, 2020).

A endotelite induzida pela COVID-19 pode ser a explicação do comprometimento sistêmico da função microvascular em diferentes órgãos de pacientes com COVID-19 (Varga *et al.*, 2020). Análises histopatológicas post-mortem de paciente com falência múltipla de órgãos revelaram endotelite em diversos órgãos como pulmão, rins e coração (Varga *et al.*, 2020). Além disso, alguns autores descrevem, também com base em evidências histopatológicas, a COVID-19 como uma doença microvascular e endotelial, na qual disfunção endotelial é o centro do agravamento da doença (Libby & Lüscher., 2020; Lowenstein & Solomon., 2020). O conjunto desses dados indica a necessidade de melhor compreensão a respeito dos mecanismos de ativação e disfunção endotelial durante o curso da COVID-19, para que, assim, alvos terapêuticos possam ser desenvolvidos e as complicações da doença, minimizadas.

## **2. JUSTIFICATIVA**

As manifestações clínicas respiratórias e sistêmicas reportadas na COVID-19 estão relacionadas aos efeitos da replicação viral e ao disparo de respostas pró-inflamatórias e pró-trombogênicas. Nesse sentido, o desenvolvimento de endotelite tem sido reportado em pacientes com COVID-19, possivelmente associada a edema alveolar, infiltrado inflamatório e trombose (Ackermann *et al.*, 2020; Varga *et al.*, 2020; Garvin *et al.*, 2021). Autores sugerem, a partir de evidências histopatológicas, que a endotelite induzida pela COVID-19 possa ser a explicação do comprometimento sistêmico da função microvascular em diferentes órgãos nos pacientes da doença (Varga *et al.*, 2020). No entanto, não se sabe se a própria replicação viral nas células endoteliais pode estar envolvida no desenvolvimento de endotelite e quais as consequências na progressão da COVID-19. Embora existam muitos dados na literatura a respeito da infecção e ativação de células endoteliais de diversos tecidos, muitas das informações são controversas. Diversos trabalhos demonstraram a presença de antígenos virais em células endoteliais de diferentes tecidos, entretanto, a replicação viral em modelos *in vitro* não está bem descrita na

literatura. Um estudo detectou, além da presença da proteína S viral, a presença de genoma de SARS-CoV-2 no interior de HBMECs infectadas, sugerindo haver replicação nesse modelo *in vitro* (Yang *et al.*, 2020) Entretanto, nesse trabalho não foi demonstrada a liberação de partículas infecciosas, não sendo possível confirmar que o ciclo replicativo do SARS-CoV-2 tenha sido finalizado nas HBMECs. Assim, a replicação produtiva em células endoteliais e o papel da infecção na indução da endotelite ainda requerem esclarecimento. No presente trabalho, avaliamos se a linhagem celular de endotélio microvascular cerebral humano (HBMECs) são susceptíveis e permissivas ao SARS-CoV-2, utilizando células superexpressando o receptor ACE-2 ou não. Avaliamos, ainda, se a infecção modula a ativação celular e a dependência de infecção produtiva nesse processo.

### **3. OBJETIVOS**

Desenvolver um modelo *in vitro* para o estudo da infecção e ativação de células endoteliais pelo SARS-CoV-2.

#### **3.1. Objetivos Específicos**

- 3.1.1.** Avaliar se a linhagem de células de endotélio microvascular cerebral humano (HBMEC) são produtivamente infectadas e ativadas pelo SARS-CoV-2;
- 3.1.2.** Avaliar se a suscetibilidade e a permissividade das HBMECs à infecção pelo SARS-CoV-2 pode ser modulada por estímulos inflamatórios;
- 3.1.3.** Avaliar se a construção de um pseudovírus carreando o mRNA da ACE-2 humana é capaz de induzir superexpressão de ACE-2 em HBMECs;
- 3.1.4.** Avaliar se HBMECs superexpressando ACE-2 tornam-se suscetíveis e permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2;
- 3.1.5.** Avaliar se HBMECs superexpressando ACE-2 são ativadas e aumentam a expressão de mediadores pró-inflamatórios quando infectadas pelo SARS-CoV-2.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Linhagens celulares

A linhagem de células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMEC) foi gentilmente cedidas pelo Dr Dennis J. Grab (The Johns Hopkins University, Baltimore, MD, EUA) e foi cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alta glicose (Life Technologies, Grand Island, NY), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Células Vero E6 foram gentilmente cedidas pelo Dr Amilcar Tanuri (Instituto de Biologia, UFRJ) e cultivadas em meio DMEM de alta glicose suplementado com 5% de SFB. Células HEK293-T e HEK293-ACE-2 foram cedidas cordialmente pela professora Luciana Costa (Instituto de Microbiologia, UFRJ) e cultivadas em meio DMEM de alta glicose suplementado com 10% de SFB. Todas as células foram armazenadas em estufa a 37°C em ambiente úmido com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>. As condições de cultivo de células livres de micoplasma são rotineiramente verificadas pela presença de DNA citoplasmático em microscópio de fluorescência, utilizando sonda DAPI (1.5µg/ml, Santa Cruz, Biotechnology), e por PCR, com mistura de oligonucleotídeos para detecção específica de micoplasma.

### 4.2. Vírus

Foram obtidos diferentes isolados de SARS-CoV-2 de amostras de esfregaço de nasofaringe de pacientes atendidos no centro de triagem de COVID-19 na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os primeiros vírus identificados foram nomeados como RJ1(GISAID: 528539) e RJ2 e, após sequenciamento, classificados como pertencentes a linhagem A2 e B1, respectivamente (Voloch *et al.*, 2021). Posteriormente, foram isoladas outras duas variantes identificadas como pertencentes à linhagem Delta e Omicron BA5 (GISAID: 7699344). Os quatro isolados virais foram cedidos gentilmente pela Dra Luciana Jesus da Costa (IMPG, UFRJ, RJ).

Todos os procedimentos com vírus infecciosos foram realizados em laboratórios NB3 no Instituto de Biologia no laboratório do Dr Amilcar Tanuri, pela Dr. Isadora Alonso (IMPG, UFRJ, RJ). Os estoques virais são mantidos a -80°C e titulados por ensaio de plaque, como descrito a seguir.

### 4.3. Propagação de SARS-CoV-2

As células Vero E6 foram cultivadas na concentração de 3x10<sup>6</sup> células em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (Get biofilm) contendo 15mL de meio DMEM de alta glicose

suplementado com 5% de SFB até atingirem confluência de aproximadamente 60%. Em seguida, as células foram lavadas com 2mL de PBS para retirada do meio metabolizado e, posteriormente, foram incubadas com os diferentes isolados de SARS-CoV-2 (RJ1, RJ2, Omicron BA5 ou Delta), utilizando-se MOI de 0,1 em 5mL de DMEM de alta glicose sem SFB. Após 90 minutos de incubação sob leve agitação periódica (20 em 20 minutos) para facilitar adsorção viral uniforme, foi adicionado 10mL de meio DMEM fresco suplementado com 2% de SFB nas garrafas e incubadas em estufa a 37°C por 4 dias. Posteriormente, foi coletado o meio de cada garrafa, e filtrado em filtros de 0,22 µM para remoção dos restos celulares. O sobrenadante contendo vírus foi armazenado em alíquotas a -80°C para posterior titulação.

#### **4.4. Construção de pseudovírus e transfecção *in vitro* de células HEK293-T**

A construção de um vetor lentiviral para transduzir o mRNA codificador proteína ACE-2 humana em HBMECs (pseudovírus - p-ACE-2), o qual foi utilizado no presente trabalho, foi realizada pelo pós-doutorando e co-orientador do TCC Dr. Sharton V. A. Coelho. Para geração do vetor, foram utilizados os plasmídeos pCMV-VSV-G (Stewart et al., 2003), plasmídeo pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc e o plasmídeo pHAGE2-EF1a ACE-2 (BEI Resources NR-52512) para a formação de um pseudovírus contendo o arcabouço do HIV-1 depletado para o gene da proteína de envelope (Env) e possuindo no lugar do gene viral nef, o gene repórter da NanoLuciferase (Schmidt et al., 2020). Além disso, a construção lentiviral contém em sua superfície a proteína G do VSV e carrega o gene da proteína ACE-2 humana. Os plasmídeos foram amplificados em *E. coli* (Max Efficiency stbl2) e purificados segundo os protocolos do fabricante dos kits utilizados (Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Alemanha) (PureLink HiPure Kit, Thermo Fischer Scientific, EUA).

Em seguida, células HEK293-T foram plaqueadas em placas de Petri contendo  $5,5 \times 10^6$  células e foram incubadas ON a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, foi realizada a transfecção da cultura de células com Cloreto de Cálcio. Para isso, 20 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5M foi diluído em 180 µL de H<sub>2</sub>O e a essa solução foi adicionado 200 µL de tampão BES. A quantidade de DNA total (24 µg) foi adicionada à solução e incubada à temperatura ambiente por 40 minutos. Após o período de incubação, as placas de Petri foram lavadas e foi adicionado meio DMEM fresco suplementado com 2% de SFB. A solução final da transfecção foi adicionada às placas de células e foram incubadas por 48 horas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, foi realizada a troca do

meio e coleta do sobrenadante. As culturas receberam 10mL de meio DMEM fresco suplementado com 2% de SFB, penicilina 100 und/mL e estreptomicina 100 mg/mL e incubada á 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48h da transfecção, foi realizado o mesmo procedimento de coleta do sobrenadante e as placas foram descartadas. Os sobrenadantes recolhidos nos dois tempos foram centrifugados a 5000 x g por 3 minutos para eliminação de células mortas e, posteriormente, filtrado com filtro de PVDF (Fluoreto de polivinilideno) ou PES (Polietersulfona) de 0,22 µM para purificação do pseudovírus. O conteúdo filtrado foi armazenado no freezer a - 80 °C em alíquotas de 500 µL. Foi realizada a construção de um pseudovírus controle contendo 16 µg de pCMV-VSV-G e 8 µg de pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc e um pseudovírus de uso experimental para superexpressar ACE-2 humana em HBMECs contendo 12,9 µg pCMV-VSV-G, 3,7 µg de pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc e 3,7 µg de pHAGE2-EF1a ACE-2. O estoque de pseudovírus apresentava 420pg/mL da proteína p24Gag de HIV.

#### **4.5. Estimulação de HBMEC *in vitro* com pseudovírus**

HBMECs foram cultivadas em placas de 24 poços (5x10<sup>4</sup> células/500 µl /poço) ou 96 poços (10<sup>4</sup> células/200 µl /poço) em DMEM contendo 10% SFB. As células foram incubadas em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>, overnight (ON), para adesão. No dia seguinte, o meio metabolizado foi retirado, as células foram lavadas com 200 µl de meio sem SFB, e, então, infectadas com diferentes volumes de pseudovírus, a depender do experimento. As células foram novamente incubadas e, após 24, 48 e 72 horas foi coletado o lisado celular para análise da expressão proteica de ACE-2 por western blotting, como descrito posteriormente. Além disso, foram realizadas análises da viabilidade celular de HBMECs nos mesmos tempos de infecção utilizando o kit Cell Titer Aquous, como descrito a seguir.

#### **4.6. Ensaio de Luciferase**

Após a infecção das HBMECs com P-ACE-2, as células foram lavadas com PBS 1x e lisadas usando 200 µL/poço do reagente Luciferase Cell Culture Lysis 1X Reagent-CCLR (Promega, Madison, WA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, o lisado foi submetido a agitação rápida no vórtex e centrifugado a 6000 rpm durante 2 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e volumes de 20 µL de lisado celular foram adicionados a 50 µL de substrato enzimático Luciferase Assay Reagent (Promega) em uma placa de 96 poços branca opaca, (Greiner - Bio One) para medição da

luminescência em um luminômetro (GloMax®-Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados analisados foram apresentados em unidades relativas de luminescência (RLU).

#### **4.7. Infecção e estimulação de HBMEC *in vitro* com SARS-CoV-2**

HBMECs foram cultivadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$  células/500  $\mu$ l /poço) ou 96 poços ( $10^4$  células/200  $\mu$ l /poço) em DMEM contendo 10% SFB. As células foram incubadas em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>, overnight (ON), para adesão celular. No dia seguinte, o meio metabolizado foi retirado, as células foram lavadas com 200  $\mu$ l de meio sem SFB, e, então, inoculadas com SARS-CoV-2 (RJ1, RJ2, Omicron BA5 ou Delta), em MOI de 0,1, diluídos em meio sem soro. Como controle negativo, as células foram incubadas com mock. Após duas horas de incubação sob leve agitação periódica (20 em 20 minutos) para adsorção uniforme das partículas virais, as células foram lavadas com PBS 1x, foi adicionado meio completo, e as células foram incubadas novamente em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub>. Em alguns experimentos, as HBMECs foram pré-estimuladas com 1000 U de IFN- $\beta$  (24h), LPS 1 $\mu$ g/mL (4h) ou então TNF na concentração de 10ng/mL (4h) e, posteriormente, infectadas ou não com SARS-CoV-2 (MOI 0,1).

O lisado celular e o sobrenadante foram coletados após diferentes períodos de tempo (24h, 48h, 72h), a depender do experimento. A expressão de mRNA correspondente a ACE-2 foi avaliada por RT-qPCR e a expressão proteica de ACE-2 e CD-147 por Western blotting, como descrito posteriormente. A infecção viral foi analisada por ensaio de plaque ou qRT-PCR, como descrito a seguir.

#### **4.8. Titulação de SARS-CoV-2 por ensaio de plaque**

As células VERO E6 foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço, contendo 500 $\mu$ l de meio DMEM de alta glicose suplementado com 5% de SFB e incubadas ON para adesão completa. No dia seguinte, o meio metabolizado foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x e foram cultivadas por 2 horas com os sobrenadantes obtidos das culturas de HBMECs previamente infectadas, como descrito. Estes sobrenadantes foram utilizados em diluições na base 10 ( $1-10^{-6}$ ) no meio DMEM de alta glicose sem SFB e adicionados nos respectivos poços

contendo células VERO E6. Após 2 horas, o sobrenadante foi removido, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e foi adicionado 1,5% carboximetilcelulose (CMC - Sigma Aldrich) em 1mL de DMEM de alta glicose suplementado com 2% de SFB.

A placa foi incubada em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO<sub>2</sub> por 5 dias e, após esse período, foram fixadas com formaldeído 4% ON. Posteriormente, as células foram coradas com cristal violeta 1% diluído em 20% de metanol por 1 hora, seguido de lavagem com água corrente. Os plaques formados foram contados e os títulos virais foram calculados utilizando-se a fórmula: n° de plaques x diluição x 5 e o resultado expresso na unidade de PFU/mL.

#### **4.9. Avaliação da expressão proteica de receptores de SARS-CoV2, ACE2 e CD147 e da proteína N viral por western blotting**

HBMECs foram pré-infectadas ou não com p-ACE-2. Em alguns experimentos, após infecção com P-ACE-2, também foram infectadas com SARS-CoV-2 (RJ1, omicron ou delta) e então coletadas em em 100µl de RIPA com 1% de inibidor de protease (IP) em cada poço de placas de 24 poços (CellStar). Assim, as amostras do lisado foram preparadas em tampão de amostra contendo 50 nM de Tris-HCl, pH 6,8; 100nM de β-mercaptoetanol; 2% de SDS; 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol, e foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos para desnaturação total das proteínas.

Em seguida, 40 µl de cada uma das amostras foram aplicadas em um sistema mini-gel da Biorad contendo gel poliacrilamida a 8% (SDS-PAGE), que é formado por uma camada de gel de empacotamento (SDS 0,1%; acrilamida 5%; bis-acrilamida 0,25%; Tris-HCl 0,22 M, pH 6,8; TEMED 0,04% e persulfato de amônio 0,08%) e uma camada do gel de separação (SDS 0,1%; acrilamida 10-15%; bis-acrilamida 0,04-0,05%; Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8; TEMED 0,02% e persulfato de amônio 0,5%). A corrida foi realizada a 90 V em tampão Tris-Glicina pH 8,8 contendo SDS por aproximadamente 90 minutos. Como padrão para comparação do peso molecular da proteína de interesse, foi utilizado o PageRuler™. Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose ON pelo uso do sistema de transferência Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Biorad -EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a etapa de transferência, as membranas foram bloqueadas com 9% de leite desnatado (Molico) diluído em tampão de lavagem (TBS 1X contendo 0,1% de Tween-

20) por 1 hora. Em sequência, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: (i) anti-ACE-2 (1:1000, Invitrogen, CL4035), monoclonal, marcando a isoforma de 130KDa de ACE-2, a qual supostamente é a isoforma transmembrana de superfície e responsável pela ligação com a proteína S de SARS-CoV-2; (ii) anti-ACE-2 (Abcam, ab108252 ou Abcam, ab272500), monoclonal, marcando diferentes isoformas de ACE-2; (iii) anti-CD147 (Invitrogen, 1:1000); (iv) e anti-Nucleocapsídeo (1:1000; Cell Signaling Technology), ON a 4°C. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3x por 10 minutos com o tampão de lavagem (TBS com 0,1% de Tween 20) sob leve agitação no shaker. Posteriormente, foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho (1:5000, KPL) por 1 hora sob agitação, lavadas 3x com TBS-T sob agitação e foi realizada a revelação em sala escura com o uso de reagentes luminol e peróxido de hidrogênio (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific)

#### **4.10. Avaliação da replicação viral, da expressão de mediadores inflamatórios e de ACE-2 por RT-qPCR**

As células e os sobrenadantes provenientes das culturas de HBMECs infectadas ou não com P-ACE-2 e/ou com SARS-CoV-2, a depender do experimento, foram recolhidos nos períodos indicados e a extração de RNA total feita a partir do uso do reagente TRIzol de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa e síntese de cDNA são feitas através do uso do kit High-Capacity cDNA Archive (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando-se 1µg de RNA total e random primers, e seguindo os parâmetros de temperatura: 25°C por 10 min, duas etapas de 37°C por 60 min, 85°C por 5 min e armazenado em -20°C.

Para análise da infecção de SARS-CoV-2 em HBMECs, o cDNA correspondente a proteína N viral foi amplificado por qRT-PCR, a partir do StepOne™ Real-Time PCR System com o mix de TaqMan (ThermoFisher Scientific). Além disso, a análise de RNA subgenômico (sgRNA) intracelular foi feita utilizando GoTaq® Probe-1-Step RT-qPCR System a partir do uso dos primers descritos na Tabela 1. Para cada reação foi feito um mix contendo 10µL de GoTaq probe qPCR master mix, 0,4 µL de GoScript RT mix, 0,08 µL de 1000µL de sonda, 4,4 µL de água livre de nuclease e 5µL de RNA. As reações de qPCR foram realizadas no Aria MAX (Agilent) seguindo a ciclagem de 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos, 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 53°C por 30 segundos.

Os resultados obtidos a partir da amplificação de sgRNA no lisado celular foram normalizados pela expressão de mRNA de GAPDH das amostras como controle endógeno. Para isso, as reações foram realizadas utilizando o reagente SybrGreen (Thermo Fisher Scientific Inc.) com a mesma ciclagem utilizada para expressão de mRNA descrita anteriormente. Os resultados foram representados pela relação entre o cycle threshold (CT) do sgRNA e o CT de GAPDH de cada amostra.

Para análise da expressão de citocinas e ACE-2, o cDNA foi amplificado através da técnica de PCR em tempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific Inc.) usando o reagente master mix Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando primers específicos para IL-8, CCL-2, CCL-5 ACE-2 e GAPDH (Integrated DNA Technologies, Inc.) com as sequências presentes na **Tabela 1**. As amostras passam por ciclos de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos, com 1 ciclo consistindo em desnaturação (95°C 15 segundos), anelamento do primer (55°C, 30 segundos) e extensão do primer (60°C 1 minuto). Após isso, o método comparativo de CT ( $\Delta\Delta CT$ ) é usado para quantificar os níveis de expressão gênica baseado na normalização pelo GAPDH humano como controle endógeno.

**Tabela de primers: Iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR**

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>
<b>Subgenômico N senso</b>	CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTCTAAACGAACAAATTAA AT
<b>Subgenômico N antisenso</b>	TCTGGTTACTGCCAGTTGCCTCTG
<b>Subgenômico N sonda FAM</b>	ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC
<b>GAPDH senso</b>	GTGGACCTGACCTGCCGTCT
<b>GAPDH antisenso</b>	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
<b>CCL-5 senso</b>	CCAGCAGTCGTCTTTGTCAC
<b>CCL-5 antisenso</b>	CTCTGGGTTGGCACACACTT
<b>CCL-2 senso</b>	CAGCCAGATGCAATCAATGCC

<b>CCL-2 antisenso</b>	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
<b>ACE-2 senso</b>	GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA
<b>ACE-2 antisenso</b>	AGGAGGTCTGAACATCATCAGT
<b>IL-8 senso</b>	CAGCCAAAACCTCCACAGTCA
<b>IL-8 antisenso</b>	TTGGAGAGCACATAAAAACATCT

#### 4.11. Viabilidade Celular

A viabilidade celular das HBMECs infectadas com SARS-CoV-2 foi avaliada através de duas metodologias distintas, a depender do experimento. Foi realizada análise da liberação da enzima lactato-desidrogenase (LDH) (Kit LDH-Doles, Cidade de Goiânia, Brasil) no sobrenadante celular após diferentes períodos de tempo de infecção com SARS-CoV-2. O ensaio de LDH consiste em reações químicas desencadeadas por uma mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopirido nucleótido (NAD), fenazina metasulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina. Primeiramente, a reação entre lactato e NAD permite a formação de NADH e piruvato. Em seguida, adiciona-se o FMS que irá promover a formação dos compostos NAD e FMS reduzidos. O FMS reduzido irá, então, reagir com o alumínio ferroso, gerando o complexo corado. A cor gerada na reação foi evidenciada por luminômetro (GloMax®-Promega), com absorvância de 600nm. Já para as células infectadas com P-ACE-2 foi utilizado o método de CellTiter Aqueous One Solution para acompanhamento da viabilidade das HBMECs. O ensaio consiste no uso de dois compostos: um composto tetrazólico [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetilxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio; MTS] e um reagente de acoplamento de elétrons (fenazina etosulfato; PES). O PES combinado ao MTS forma uma solução estável, a qual é adicionado 25µL diretamente nos poços de cultura de células para incubação de aproximadamente meia hora. Posteriormente, após observação da cor gerada, para-se a reação com 25µL de SDS 10%. A análise da cor gerada no experimento foi evidenciada por luminômetro (GloMax®-Promega) com absorvância de 490nm. O controle positivo de morte de ambas as metodologias foi realizado pelo uso de 1% de Triton X-100.

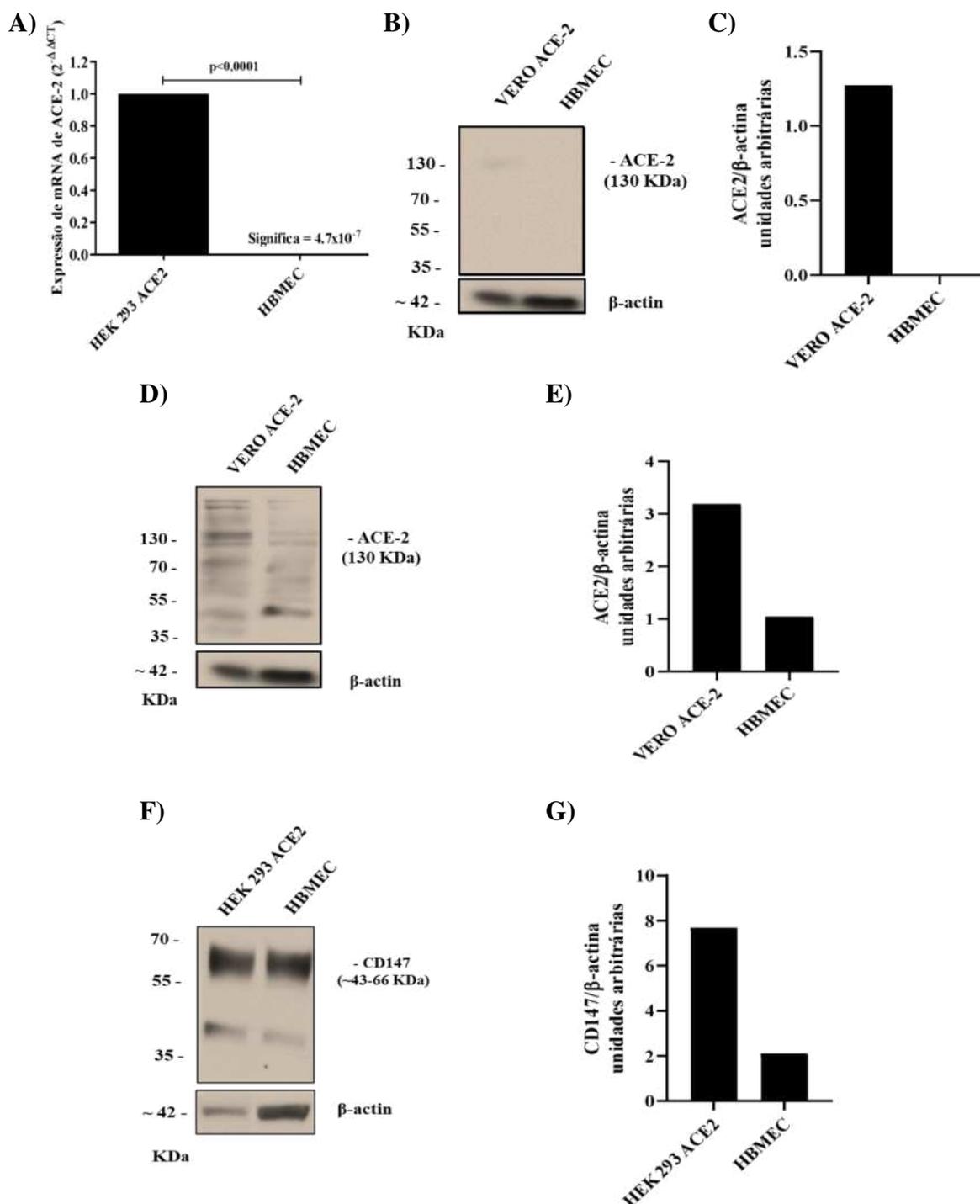
#### 4.12. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com software GraphPad Prism 8®, com os testes One-way Anova para múltiplas comparações, Two-way Anova para múltiplas comparações em mais de um tempo e teste T para comparações duplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. HBMECs expressam os receptores celulares de entrada do vírus, mas não ocorre replicação produtiva do SARS-CoV-2 *in vitro*

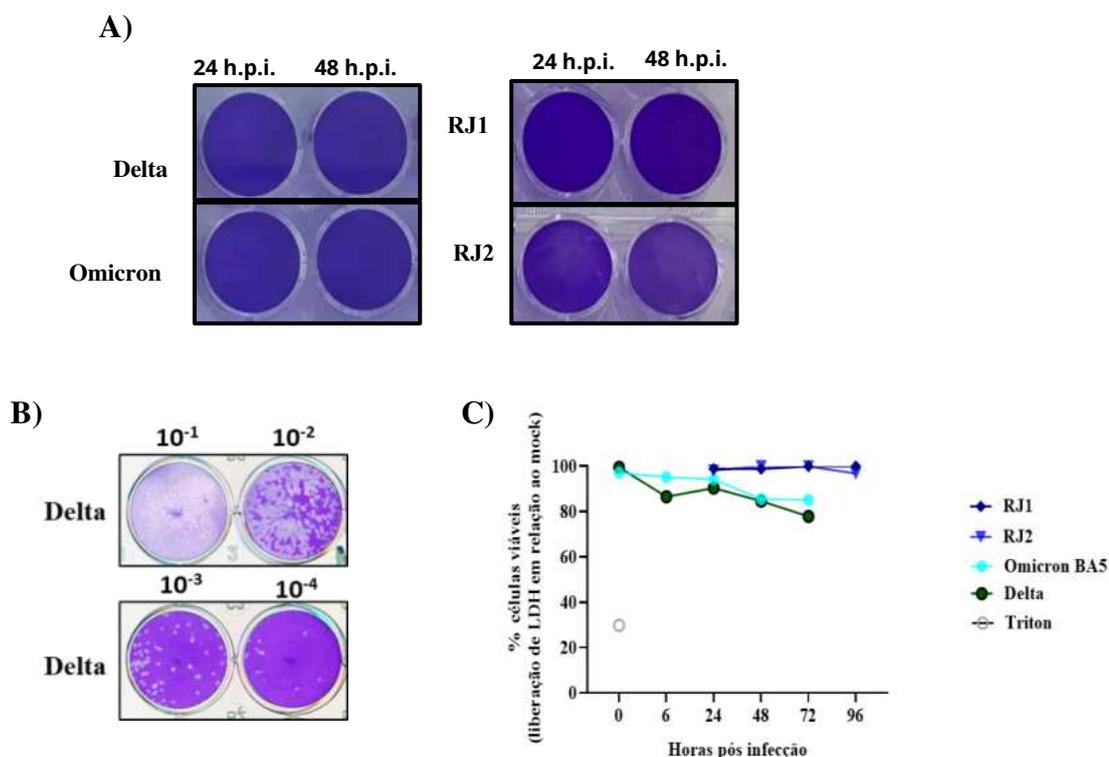
A fim de estabelecer um modelo de infecção e estudo da ativação endotelial *in vitro*, avaliamos, em um primeiro momento, se células endoteliais da microvasculatura cerebral humana (HBMECs) sustentam a infecção produtiva do SARS-CoV-2. Essas células têm sido largamente utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa em diferentes modelos de infecção viral para investigação da própria replicação viral e seu efeito sobre a ativação e permeabilidade vascular. Inicialmente avaliamos a expressão dos receptores ACE-2 e CD147, ambos descritos na literatura como receptores de ligação e entrada do vírus em células alvos (Hoffmann *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Como controle positivo, utilizamos células HEK293T ou VERO-E6 transduzidas com ACE-2 humana (HEK-ACE-2; Schmidt *et al.*, 2020; VERO-ACE2; ATCC NR-54970). Análises por RT-qPCR evidenciaram que HBMECs expressam mRNA de ACE-2, porém em níveis inferiores ao observado em células HEK-ACE-2 (Figura 1A). A expressão proteica do receptor foi analisada por western blotting, utilizando dois anticorpos com especificidades diferentes. Inicialmente, na figura 1B e 1C não detectamos a presença da expressão de ACE-2 nas HBMECs e nem no controle positivo realizado com células VERO-ACE2 ao realizamos marcação com o anticorpo que reconhece, especificamente, a isoforma de 130KDa, reportada como sendo a forma transmembranar de superfície e supostamente responsável pela ligação com a proteína S viral (Ng *et al.*, 2020; Blume *et al.*, 2021; Scagnolari *et al.*, 2021). Tendo em vista esse resultado, realizamos novas marcações utilizando anticorpos anti-ACE-2 que detectassem outras isoformas da proteína além de 130 kDa, e pudemos observar que HBMECs expressam baixos níveis proteicos de ACE-2 (Figura 1C e D). O mesmo também foi observado para expressão de CD147 entre ambas as células (Figura 1E e F).



**Figura 1: Análise da expressão de ACE-2 e CD147 em HBMECs.** (A-I) Análise da expressão de mRNA ou expressão proteica de ACE-2 e CD147 em HBMECs por q RT-qPCR e western blotting, respectivamente. Células HEK 293-T ou VERO superexpressando ACE-2 foram utilizadas como controles positivos. (A) Expressão de mRNA de ACE-2 em HBMECs e células HEK 293-T ACE-2 (N=1). (B e C) Expressão proteica de ACE-2 em HBMECs e células VERO-ACE-2 (anticorpo para ACE2 130kDa Invitrogen, CL4035) (N=1). (C e D) Expressão proteica de ACE-2 em HBMECs e células VERO-ACE-2 (anticorpo para diferentes isoformas de ACE2 Abcam, ab272500) (N=1). (E e F) Expressão proteica de CD147 em HBMECs e células HEK 293-T ACE-2 (N=1). A expressão do mRNA de GAPDH foi utilizada como controle endógeno. B-F) foram utilizadas a expressão proteica de β-actina como controle endógeno para normalização.

Em seguida, avaliamos se HBMECs sustentam a infecção produtiva do SARS-

CoV-2. Para isso, as HBMECs foram infectadas com quatro isolados virais distintos (RJ1, da linhagem A2, RJ2 da linhagem B1, omicron e delta), utilizando MOI 0,1. Após incubação por diferentes períodos, foi coletado o sobrenadante para observação da liberação de partículas infecciosas por ensaio de placa. Não foram detectadas placas de lise para nenhum dos isolados virais (Figura 2A), quando comparado ao controle positivo de infecção realizado em células VERO E6 infectadas com a variante delta por 48 horas (Figura 2B), indicando que HBMECs não são permissivas à replicação por esses vírus. Condizente com os resultados obtidos, não foram observadas alterações na viabilidade celular para nenhum dos isolados (Figura 2C).



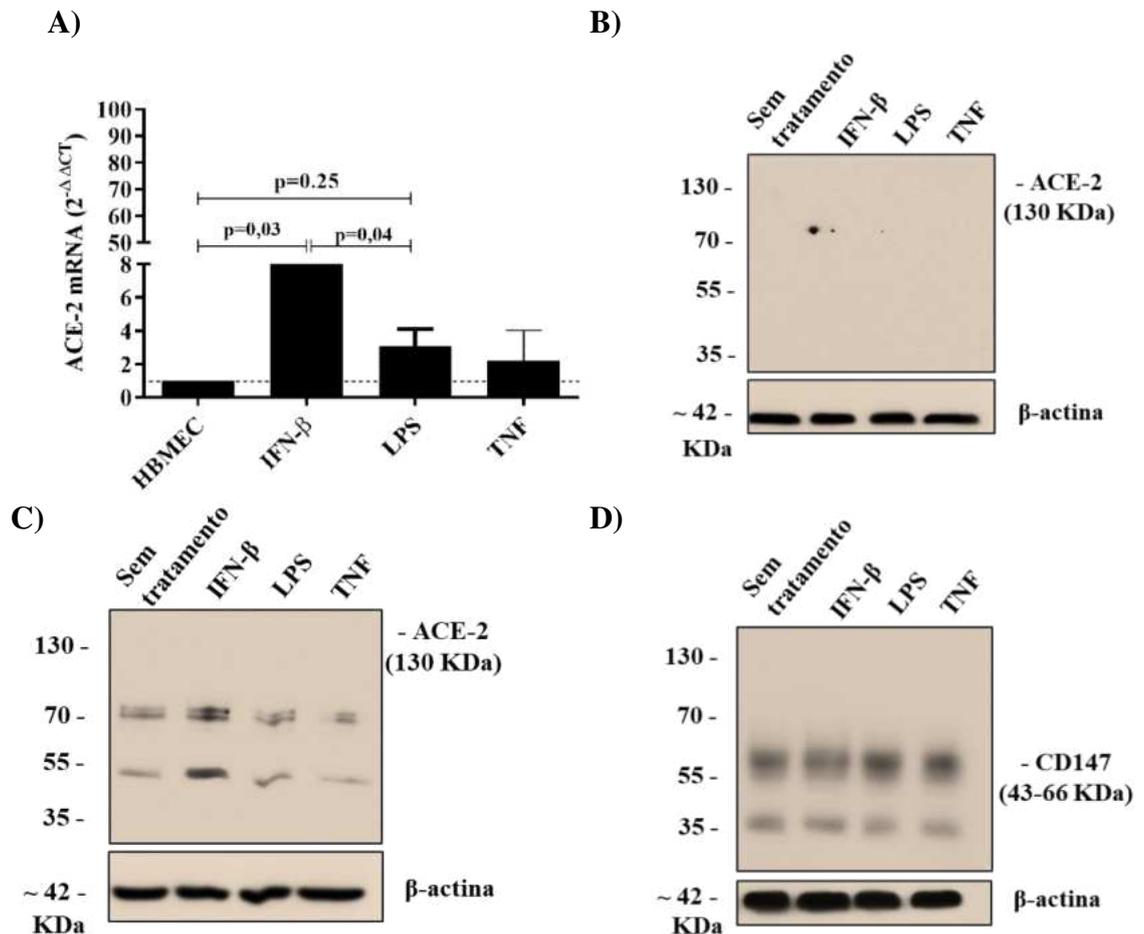
**Figura 2: HBMECs não são permissivas ao SARS-CoV-2.** (A) Análise da formação de plaques em HBMECs infectadas com 4 isolados virais (RJ1, RJ2, omicron e delta) com MOI de 0,1 após 24h ou 48h (N=3). (B) Controle positivo da formação de plaque em células VERO E6 infectadas com delta (MOI de 0,1) após 48h (N=3) (C) Cinética de Viabilidade celular através da liberação da enzima lactato-desidrogenase (LDH) no sobrenadante de HBMECs infectadas com os 4 isolados virais ou tratadas com Mock (N=2).

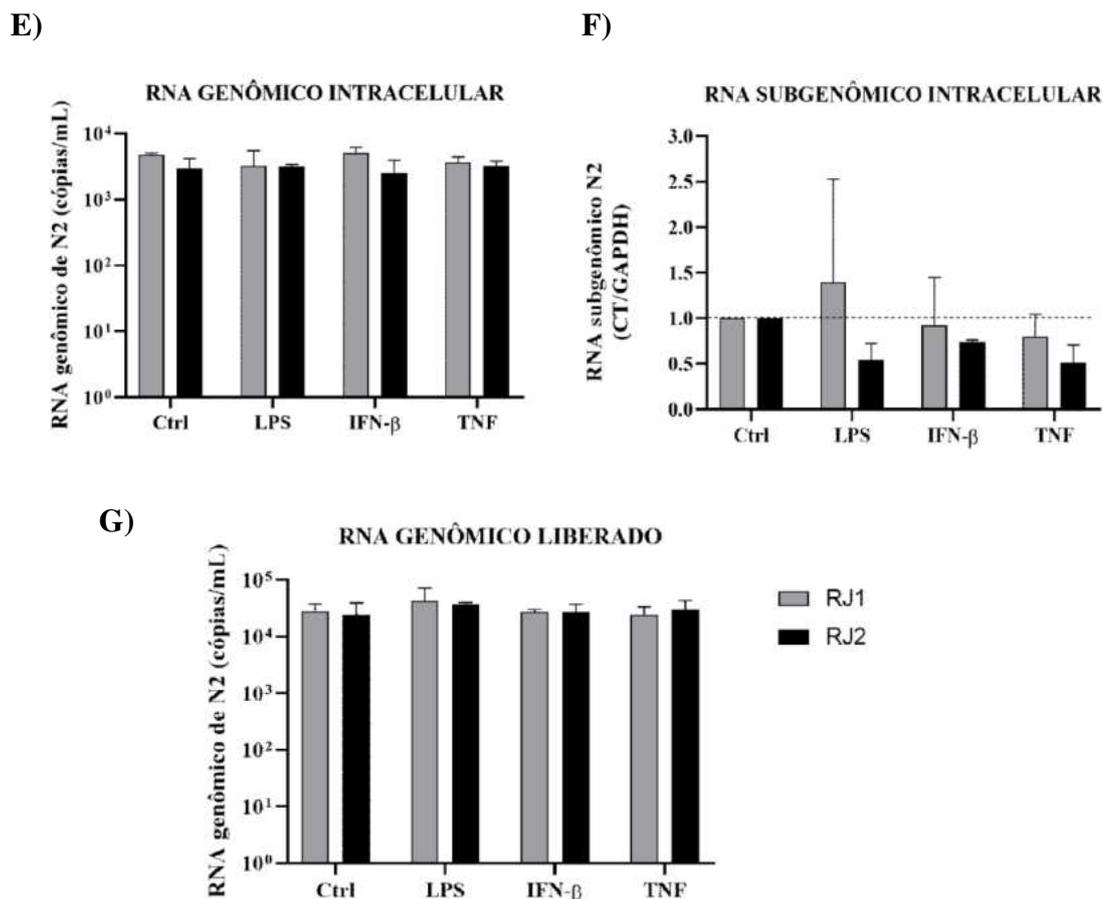
## 5.2. A pré-estimulação de HBMECs com estímulos inflamatórios não afeta a suscetibilidade e permissividade das células à infecção pelo SARS-CoV-2

O próximo passo foi avaliar se o tratamento das HBMECs com diferentes estímulos pró-inflamatórios poderia tornar as células mais suscetíveis e/ou permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2. HBMECs foram pré-estimuladas com LPS (1 $\mu$ g/mL por 4 horas), TNF (10ng/mL por 4 horas) ou com IFN- $\beta$  (1000 U por 24h), sendo este último

associado ao aumento da expressão de ACE-2 (Finney *et al.*, 2021; Ziegler *et al.*, 2020). Inicialmente, avaliamos se esses estímulos poderiam modular a expressão de ACE-2 ou CD147. Observamos que a estimulação com IFN- $\beta$  e LPS induziram aumento da expressão dos transcritos de ACE-2, quando comparado ao controle de células não tratadas (Figura 3A), o que não refletiu no aumento da expressão dessa proteína (Figura 3B, C). Da mesma forma, não observamos diferença na expressão de CD147 (Figura 3D).

Avaliamos, então, se os estímulos inflamatórios seriam capazes de tornar às HBMECs permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2. Para isso, as células foram pré-estimuladas, como descrito, e, em seguida, expostas aos isolados RJ1 e RJ2. Não observamos diferenças no número de cópias de RNA genômico intracelular e extracelular (Figura 3E e G), bem como alteração nos níveis de RNA subgenômico intracelular (Figura 3F), sugerindo que a ativação prévia das HBMECs não foi suficiente para favorecer a infecção.





**Figura 3.** A suscetibilidade e permissividade das HBMECs à infecção pelo por SARS-CoV-2 não é afetada pela pré- estimulação com estímulos inflamatórios. (A-G) HBMECs foram estimuladas com 1000 U/mL de IFN-B (24 horas), 1ug/mL de LPS por 4 horas, ou 10 ng/mL de TNF – a por 4 horas e posteriormente infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) por 48 horas (E-G) ou não (A-D). A) Expressão de mRNA de ACE-2 medida por qRT-PCR. A expressão proteica de ACE-2 foi medida por Western blotting (B-C), assim como a de CD147 (D). A infecção viral foi avaliada por qRT-PCR pela detecção de cópias de RNA da proteína N viral dentro da célula (E) ou no sobrenadante (G), além da detecção de RNA subgenômico intracelular (F). Os resultados foram normalizados pelo valor do mRNA de GAPDH (A e F), ou pela expressão da β-actina (B-D), ou pela curva de mRNA de N2 equivalente ao CT da amostra (E e G). Todos os experimentos apresentam N=1

### 5.3. Construção de um P-ACE-2 para a indução da superexpressão de ACE-2 em HBMECs

Como observamos que as HBMECs possuem baixa expressão de ACE-2 em sua superfície, hipotetizamos que isso poderia estar dificultando a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira e, conseqüentemente, contribuindo para a replicação abortiva do vírus. Nosso grupo construiu um vetor lentiviral, carreando RNAm de ACE-2 humana, o qual foi utilizado a fim de transduzir o mRNA da ACE-2 humana nas HBMECs e contornar a baixa disponibilidade do receptor viral.

Para a construção desse vetor foram utilizados três plasmídeos: o pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc que contém o arcabouço do HIV-1 depletado para a proteína de envelope (Env) e a inserção do gene repórter da NanoLuciferase no lugar do gene viral

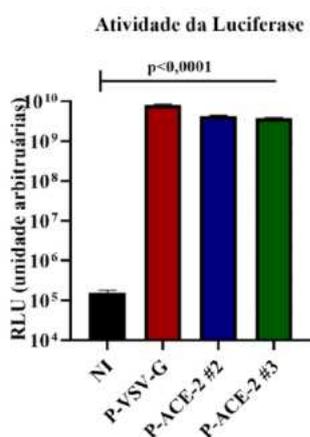


**Figura 4: Plasmídeos utilizados para construção do pseudovírus (P-ACE-2)** Células HEK-293T foram transfectadas por 48 horas com os três plasmídeos para formação de P-ACE-2, contendo: A) 3,7 µg do plasmídeo pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc; B) 12,9µg do plasmídeo pCMV-VSV-G; C) 3,7 µg do plasmídeo pHAGE2-EF1a ACE-2).

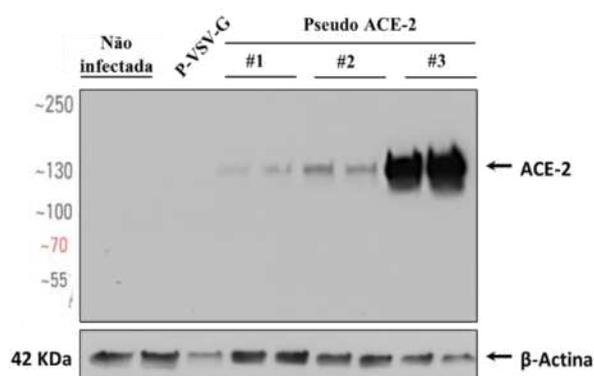
Células HEK293-T foram transfectadas com os três plasmídeos pCMV-VSV-G, pHIV-1NL4-3 ΔEnv-NanoLuc e pHAGE2-EF1a ACE-2 em diferentes concentrações (constructos #1, #2 e #3) ou apenas com os plasmídeos contendo a sequência do arcabouço e da proteína G do VSV (pseudovírus controle) para produção do pseudovírus. Para avaliar se as partículas do pseudovirus foram montadas corretamente, HBMECs foram infectadas com 200 µL de sobrenadante obtido das células HEK e 48 h.p.i, o lisado foi coletado para a avaliação da atividade da luciferase. Observamos que a atividade da luciferase foi similar e significativa para todos os constructos, incluindo o pseudovírus controle, quando comparado ao controle negativo de células que não foram infectadas com P-ACE-2, indicando que a construção da ferramenta foi bem-sucedida (Figura 5A).

Em seguida, avaliamos a expressão de ACE-2 nas HBMECs. Essa etapa é de extrema importância, uma vez que a montagem eficiente do arcabouço do pseudovírus e consequente expressão da luciferase não garante que o mRNA de ACE-2 tenha sido internalizado no interior do pseudovírus durante a etapa de transfecção. Assim, HBMECs foram infectadas como descrito anteriormente, e o lisado celular coletado para análise da expressão de ACE-2 por western blotting. Notamos que a construção P-ACE-2 #3 induziu robusta expressão do receptor viral nas HBMECs, quando comparado às construções #1, #2 ou células não infectadas (Figura 5B e C). Deste momento em diante, prosseguimos utilizando o construto P-ACE-2 #3 que se demonstrou eficiente em promover a superexpressão da proteína nas HBMECs infectadas.

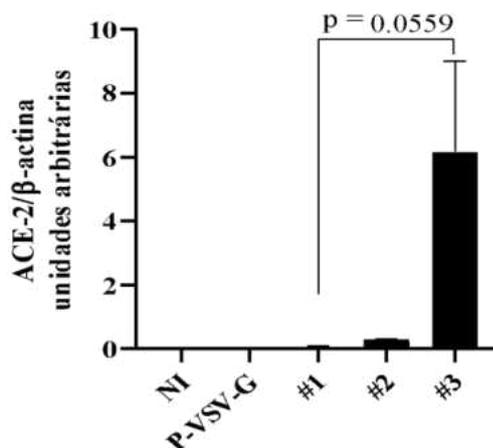
A)



B)



C)

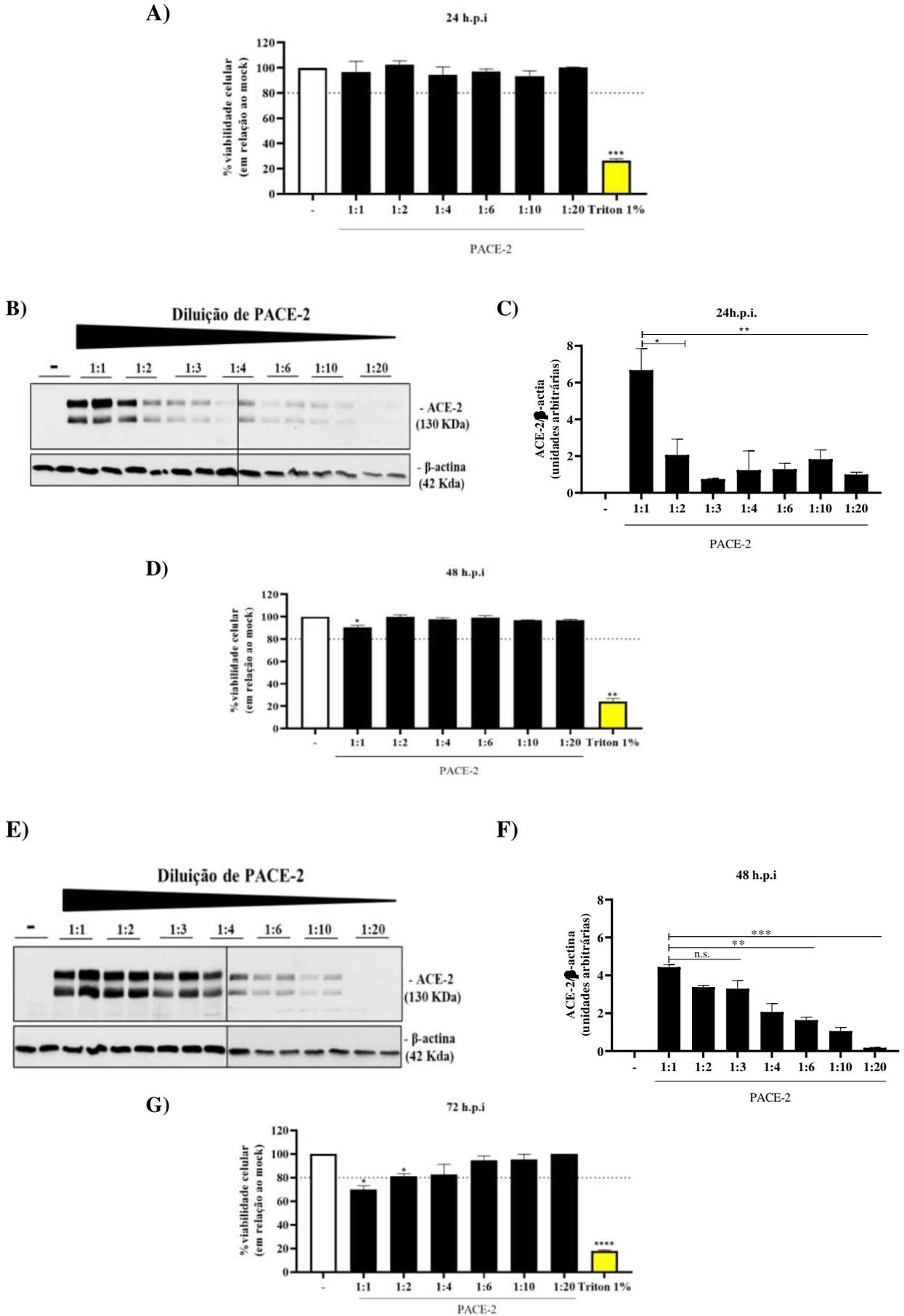


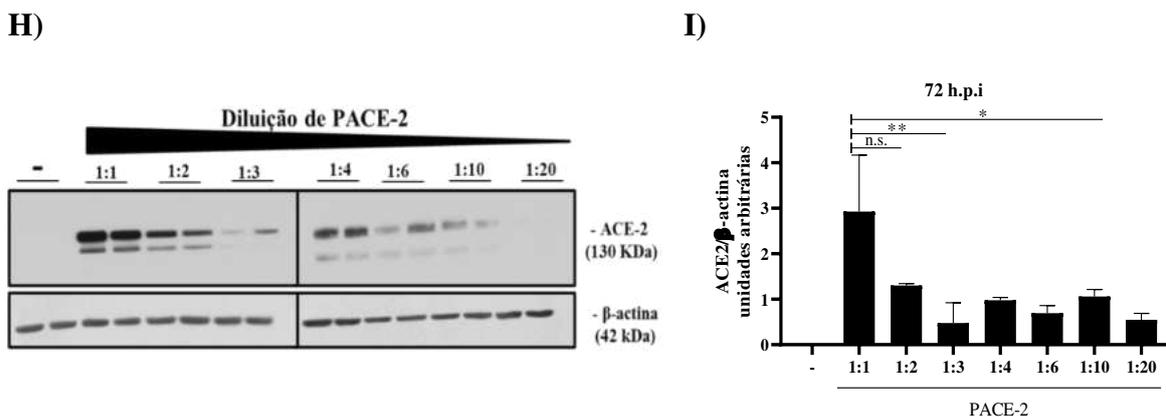
**Figura 5: Construção de um P-ACE-2 para a indução da expressão de ACE-2 em HBMECs.** As HBMECs foram infectadas com diferentes constructos de P-ACE-2, como indicado nas figuras, e foi realizada a medição da expressão de luciferase (A) ou expressão proteica de ACE-2 (B). A) Ensaio de luciferase para verificação da montagem das partículas de P-ACE-2. Os valores apresentados equivalem à média de valores obtidos na leitura das replicatas. B) Análise proteica da expressão de ACE-2 em HBMECs infectadas com três construções distintas de P-ACE-2 por wester blotting. Como controle negativo, em ambos os experimentos, foi utilizada uma construção de pseudovírus contendo 16  $\mu$ g de pCMV-VSV-G e 8  $\mu$ g de pHIV-1NL4-3  $\Delta$ Env-NanoLuc e sem a presença do plasmídeo codificante para hACE-2 e uma condição de células não infectadas. Todos os experimentos apresentam N=1

#### 5.4. Cinética da expressão de ACE-2 e da viabilidade das HBMECs infectadas com P-ACE-2

Em seguida, avaliamos tempo e os níveis de expressão de ACE2, em paralelo a uma análise da citotoxicidade de P-ACE2. Observamos que após 24 h.p.i com P-ACE-2 não houve alteração na viabilidade das HBMECs em todas as diluições utilizadas (Figura 6A), mas já foi possível notar a expressão de ACE-2 pelas HBMECs (Figura 6B e C). Nos tempos de 48 e 72 h.p.i, no entanto, a condição de P-ACE-2 não diluída levou a uma redução de 10 e 30% da viabilidade celular, respectivamente, enquanto a diluição de 2x do P-ACE-2 levou a uma queda de 20% na viabilidade no último tempo experimental e as demais diluições não apresentaram reduções significativas (Figura 6D e G). Interessantemente, após as 48h de infecção com P-ACE-2 houve uma redução da expressão de ACE-2 na condição não diluída, entretanto, as demais diluições se demonstraram com uma expressão aumentada do receptor viral, quando comparado ao tempo experimental anterior (Figura 6E e F). Após as 72h experimentais, ainda era possível detectar a expressão de ACE-2 em todas as condições (Figuras 6H e I). Sendo assim, concluímos que concentrações elevadas do pseudovírus (representado pelo volume máximo ou metade desse volume no momento da infecção) podem provocar efeito citotóxico nas HBMECs, principalmente em tempos mais tardios, sendo

necessário diluições entre 4 a 6 vezes do concentrado de P-ACE-2 para a expressão eficiente de ACE-2 sem prejuízo da viabilidade celular.



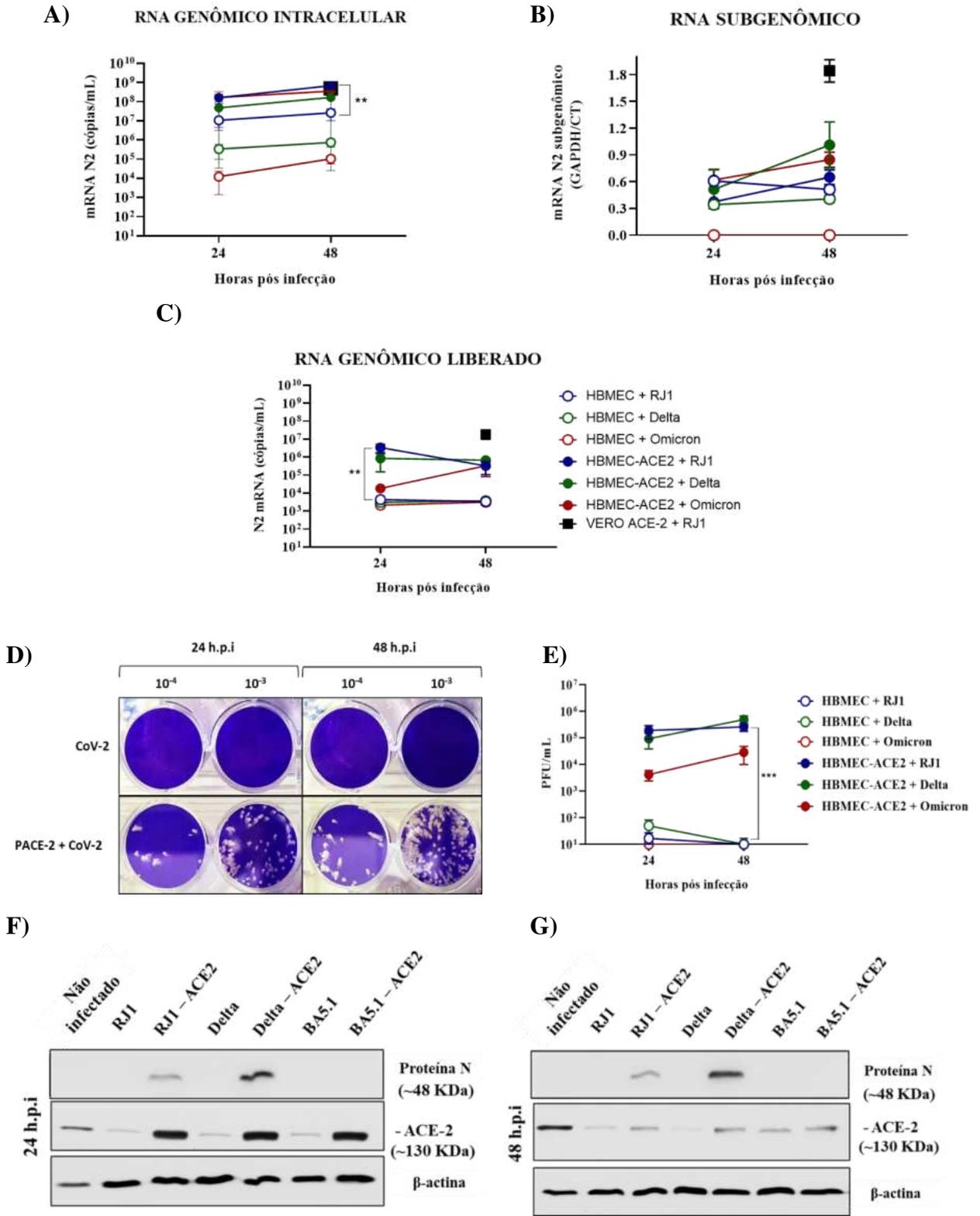


**Figura 6: Cinética da expressão de ACE-2 e da viabilidade das HBMECs infectadas com diferentes volumes de P-ACE-2.** As HBMECs foram infectadas com diferentes diluições de P-ACE-2 e foi medida a viabilidade e a expressão de ACE-2 nas células após 24, 48 e 72h p.i. A) Viabilidade das HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 24 horas. B e C) Expressão de ACE-2 nas HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 24 horas. D) Viabilidade das HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 48 horas. E e F) Expressão de ACE-2 nas HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 48 horas. G) Viabilidade das HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 72h horas. H e I) Expressão de ACE-2 nas HBMECs infectadas com diluições de P-ACE-2 por 72 horas. Em todos os ensaios, utilizamos como controle negativo células não infectadas. A expressão de ACE-2 foi normalizada pelo controle endógeno da expressão proteica da beta-actina (B, C, E, F, H e I). O controle positivo de morte foi realizado utilizando Triton 1% (A, D, G). As diluições de P-ACE-2 foram normalizadas a partir da concentração da proteína p24Gag de HIV (o estoque concentrado a 420pg/mL). Nas análises estatísticas realizadas \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; n.s. = não significativo. Todos os experimentos apresentam N=1

### 5.5. Análise da infecção de SARS-CoV-2 em HBMEC superexpressando ACE2

Após realizarmos a construção e a padronização da infecção de P-ACE-2 nas HBMECs, verificamos se as HBMECs, agora superexpressando ACE-2, se tornariam permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2. Assim, HBMECs foram infectadas ou não com P-ACE-2 por 24 h, e, em seguida, com três variantes do SARS-CoV-2. Observamos o aumento da presença de RNA genômico intra e extracelular, bem como aumento da presença de RNA subgenômico nas HBMECs superexpressando ACE-2, quando comparado às células não transduzidas, para todas as variantes (Figura 7A-C). Condizente com esse resultado, notamos a presença de partículas infecciosas no sobrenadante das células superexpressando ACE-2 após 24h de infecção (Figura 7D) e ainda em maior quantidade após 48h de infecção (Figura 7E), o que não foi observado nas células sem P-ACE-2 (Figura 7D e E). Para confirmar a infecção, avaliamos a expressão da proteína N viral em células superexpressando ou não ACE-2 infectadas com diferentes isolados de SARS-CoV-2. Observamos a marcação para proteína N viral nas células superexpressando ACE-2 quando infectadas com os isolados RJ1 ou Delta, tanto em 24 (Figura 7F), quanto em 48 h.p.i (Figura 7G), mas não nas células que não receberam o P-ACE-2 (Figura 7F e G). Além disso, a expressão de ACE-2 foi reduzida

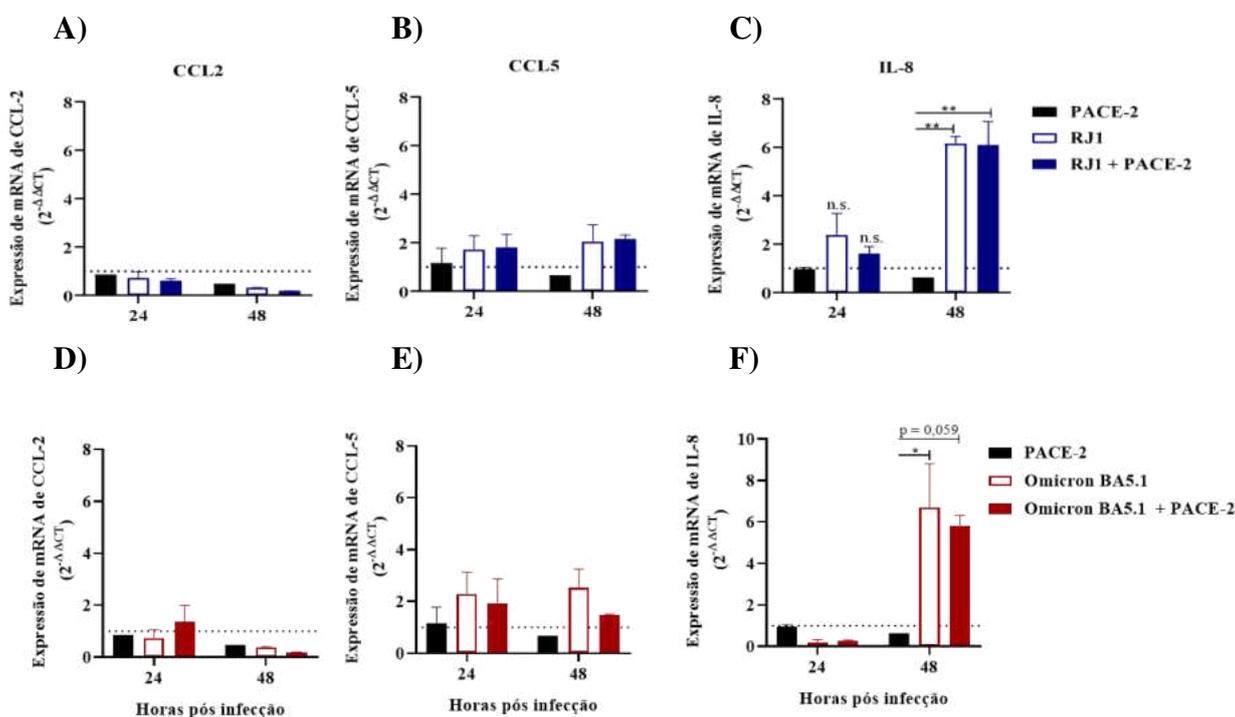
em 48 h.p.i com as diferentes variantes, sugerindo que não há manutenção da expressão de ACE-2 após alguns ciclos de replicação viral (Figura 7F, G) Em conjunto, nossos resultados demonstram que as HBMECs expressando ACE-2, mesmo que de forma transiente, foram produtivamente infectadas pelo SARS-CoV-2.

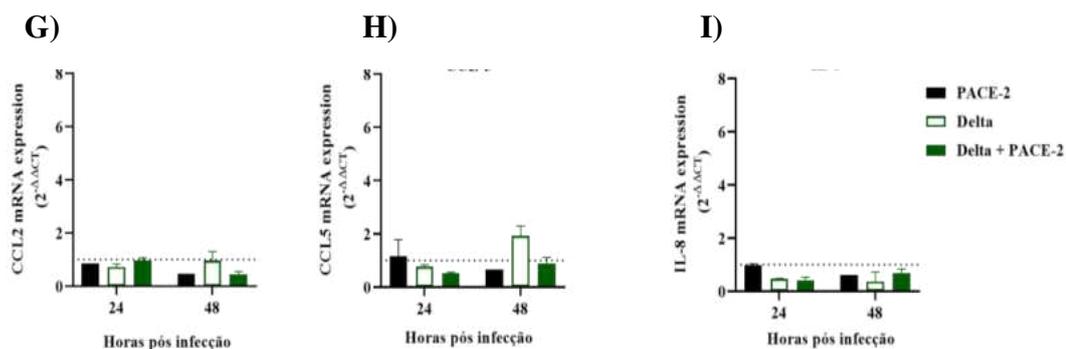


**Figura 7: HBMECs superexpressando ACE-2 são produtivamente infectadas pelo SARS-CoV-2.** As HBMECs foram infectadas ou não com P-ACE-2 e, 24h depois, infectadas com três isolados de SARS-CoV-2 ((RJ1, omicron e delta) com MOI de 0,1 por mais 24h ou 48h. **(A-C)** Análise da infecção viral por qRT-PCR pela detecção de cópias de RNA da proteína N viral dentro da célula. **(A)** ou no sobrenadante **(C)**, além da detecção de RNA subgenômico intracelular **(B)**. Os resultados foram normalizados pelo valor do mRNA do GAPDH **(B)**, ou pela curva de mRNA de N2 equivalente ao CT da amostra **(A e C)** (N=2). **(D e E)** Imagem representativa da análise da formação de plaques em HBMECs 24 e 48h.p.i. Foram realizados 3 experimentos independentes. **(F e G)** Análise da expressão proteica da proteína N viral e ACE-2 em HBMECs infectadas ou não com P-ACE-2 e, posteriormente, infectadas com 3 isolados virais (RJ1, Delta, Omicron) MOI 0,1 (N=1). Nas análises estatísticas realizadas \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; n.s. = não significativo.

## 5.6. Análise da ativação de HBMECs superexpressando ACE-2 e infectadas com SARS-CoV-2

Por fim, nos perguntamos se HBMECs expressando ACE-2 seriam ativadas pela replicação viral. Assim, infectamos ou não as HBMECs com P-ACE-2 e, em seguida, com diferentes variantes de SARS-CoV-2 e a expressão de IL-8, CCL-2 e CCL-5 foi avaliada por RT-qPCR (Figura 8A-I). Notamos que, após 48h de infecção com as variantes RJ1 e omicron, houve o aumento da expressão de IL-8, tanto nas HBMECs superexpressando ACE-2, quanto nas células não transduzidas (Figura 8C e F). Para as demais quimiocinas, não foram observadas alterações da expressão do mRNA para nenhuma das variantes utilizadas, durante os tempos experimentais. Nossos resultados sugerem que a ativação das HBMECs pelo SARS-CoV-2 independe da superexpressão de ACE-2. Esses dados estão de acordo com experimentos anteriores realizados pelo grupo, demonstrando que a proteína S recombinante induz expressão de RNAm de IL-8 em HBMECs (Dados não mostrados). Entretanto, a repetição de ambos os experimentos, bem como a realização de ensaios com partículas virais inativadas, serão necessários para confirmação desses achados.





**Figura 10: Expressão de mediadores inflamatórios pelas HBMECs superexpressando ou não ACE-2 e infectadas com três variantes de SARS-CoV-2.** As HBMECs foram infectadas ou não com P-ACE-2 e, posteriormente, infectadas com três isolados virais (RJ1, omicron e delta) com MOI de 0,1 e foi realizada a análise da expressão de mRNA de IL-8, CCL-2 e CCL-5 por RT-qPCR nos tempos indicados na figura. (A, D e G) Expressão de CCL-2 para cada um dos vírus indicado na legenda. (B, E e H) Expressão de CCL-5 para cada um dos vírus indicado na legenda. (C, F e I) Expressão de IL-8 para cada um dos vírus indicado na legenda. (A-I) Os resultados foram adquiridos em relação ao  $\Delta\Delta CT$  das células não infectadas e normalizados pelo controle endógeno do GAPDH. Nas análises estatísticas realizadas \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; n.s. = não significativo.

## 6. DISCUSSÃO

A COVID-19 promoveu diversos problemas na saúde de milhões de indivíduos ao redor do globo, tendo afetado 650 milhões de pessoas no mundo inteiro e com mais de 6 milhões de óbitos. Nos quadros graves da doença, é possível notar comprometimento sistêmico, como alterações cardiovasculares, coagulopatias, danos neurológicos e óbito. Essas complicações estão majoritariamente relacionadas à resposta inflamatória exacerbada e à disfunção endotelial. A disfunção endotelial não só promove intensificação da resposta inflamatória prévia, contribuindo para o agravamento da inflamação e infiltração de células imunes para os tecidos, como também promove perda de função anti-trombótica normal das CEs, colaborando para a formação de trombos e quadros de embolia pulmonar nos pacientes em estado grave da COVID-19. Sendo assim, buscamos compreender se a disfunção endotelial observada na doença pode ser provocada pela infecção direta das células endoteliais. Ademais, buscamos compreender quais as consequências dessa infecção no que diz respeito a ativação de Células Endoteliais da Microvasculatura Cerebral Humana (HBMECs), nosso modelo de endotélio.

Análises histológicas de pulmão post mortem de pacientes com COVID-19 demonstraram lesão endotelial (Varga et al., 2020; Ackermann et al., 2020), que podem ser resultado de infecção viral ou não. A infecção de células endoteliais foi evidenciada pela presença de corpos de inclusão intracelulares e visualização de partículas virais no interior de capilares por microscopia eletrônica (Varga et al., 2020). Análises de diferentes tecidos dos pacientes mostraram evidências de infiltrados de células mononucleares em associação à parede de vasos, e expressão de caspase 3 nessas células e nas células endoteliais também foram

reportadas, indicando o desenvolvimento de endotelite, que pode estar associada à própria infecção viral ou a eventos subsequentes a interação das CEs com células inflamatórias (Varga, et al., 2020). Apesar de demonstrações histológicas da presença de partículas virais em CEs, o processo de replicação produtiva nessas células ainda é controverso. Conde e colaboradores, utilizando CEs humanas primárias, de origem comercial, obtidas de pulmão, cérebro, intestino, e de tecido glomerular, reportaram que tais células não expressam ACE-2. Ainda, essas células não expressaram proteína de nucleocapsídeo (N) após infecção viral com alto MOI (10). A transdução de quaisquer desses tipos celulares com vetor lentiviral contendo a sequência de ACE2 permitiu a expressão de N, bem como a formação de sincícios e liberação de partículas infecciosas em tempos subsequentes (Conde, et al., 2020). No nosso trabalho também observamos que HBMECs expressam baixos níveis de ACE-2, em comparação com a expressão em outros modelos celulares sabidamente permissivos à infecção com SARS-CoV-2. Ainda, a expressão da proteína só foi detectada quando foi utilizado anticorpo que detecta diferentes isoformas da mesma, além daquela descrita como sendo a isoforma de superfície. Por outro lado, a célula também expressa de forma semelhante níveis do receptor CD147, o que poderia permitir a adsorção e entrada do vírus, como descrito anteriormente no modelo de células VERO E6 (Wang *et al.*, 2020). Não se sabe a importância da expressão dessa molécula nas células e se ela poderia suprir a baixa expressão de ACE-2 e ser suficiente para que ocorresse a entrada do vírus nas células. Por isso, infectamos as células com quatro isolados virais, Omicron, delta, RJ1 e RJ2, com MOI de 0,1 para verificar a permissividade das células à infecção.

Embora tenhamos detectado baixos níveis RNA genômico viral nos lisados celulares, não observamos aumento na liberação dessas moléculas no meio ao longo tempo e não detectamos partículas infecciosas liberadas em nenhuma das condições testadas, concluindo não haver infecção produtiva do SARS-CoV-2 nas HBMECs. Yang e colaboradores (2022) descrevem observar infecção produtiva de SARS-CoV-2 em HBMECs. Entretanto, em seu modelo *in vitro*, eles observam apenas a presença da proteína S por imunofluorescência e a presença de genoma viral no interior das células infectadas, os quais, não apresentaram aumento de expressão ao longo do tempo. A liberação de partículas infecciosas ou expressão de intermediários de replicação não foram investigados, de forma que não é possível confirmar se houve biossíntese viral completa após entrada do vírus. Nossos dados também evidenciaram a presença de RNA genômico intracelular em HBMECs selvagens, suportando a hipótese de que essa linhagem seja susceptível, mas não permissiva à replicação viral. Assim, nós hipotetizamos que a baixa disponibilidade de ACE-2 nas células poderia estar interferindo na capacidade de

infecção do SARS-CoV-2. Somado a isso, ao realizarmos um ensaio de viabilidade nas células infectadas, observamos uma pequena queda na viabilidade das células para aproximadamente 80% após 72h de infecção, nas células infectadas com omicron e delta. Essa queda possivelmente se deve ao extenso período de tempo das células plaqueadas nos poços, havendo morte celular natural. Conluímos que o vírus não foi capaz de completar o ciclo replicativo nas HBMECs e nem de causar efeito citopático nas células.

Conde e colaboradores (2020), utilizando células endoteliais primárias, de origem comercial, obtidas de diversos tecidos como, pulmão, coração, rins e, inclusive, cérebro não expressam quantidades suficientes de ACE-2 para promover a infecção produtiva de SARS-CoV-2, quando comparado ao modelo já conhecido de infecção *in vitro* de células VERO E6. Foram realizados experimentos similares ao deste trabalho para verificar a expressão de ACE-2 por western blotting e RT-qPCR, além de verificarem a infecção nas diferentes CEs através da marcação da proteína N viral, obtendo resultados semelhantes aos nossos quanto à capacidade infecciosa do SARS-CoV-2, mesmo quando utilizaram MOI de 10. Por outro lado, análises histopatológicas de tecidos humanos demonstraram que a molécula de ACE-2 é expressa no endotélio capilar de tecido pulmonar, além de ter sido detectada no endotélio vascular de cérebro, fígado, baço e na mucosa oral e intestinal (Timens *et al.*, 2004). Esses achados foram posteriormente suportados por análises globais de expressão gênica e proteica de células únicas em diferentes tecidos humanos (Hikmet *et al.*, 2020). De fato, a complexidade e heterogeneidade de células endoteliais tem sido descrita e seu fenótipo e função varia de acordo com seu status de ativação e ambiente inflamatório (Pober e Sessa, 2007; Niethamer, *et al.*, 2020; Teuwen, *et al.*, 2020). Portanto, os níveis de expressão de ACE-2 em tecidos relevantes para patogênese de COVID-19, bem como de susceptibilidade e permissividade de CEs ao SARS-CoV-2 ainda é um tema controverso.

Como as HBMECs expressam baixas concentrações de ACE-2, hipotetizamos que o pré-tratamento das HBMECs com IFN- $\beta$ , LPS ou TNF, estímulos pró-inflamatórios descritos na literatura como modulares de diferentes mecanismos de ativação de CEs, poderia tornar as células mais suscetíveis e/ou permissivas à infecção (Dauphinee & Karsan., 2006; Madge & Pober., 2001). Observamos aumento de mRNA de ACE-2 apenas nas HBMECs tratadas com INF- $\beta$ . Isso pode ser devido ao fato descrito na literatura de que o INF- $\beta$  é um conhecido modulador da expressão de ACE-2 (Ziegler *et al.*, 2020; Finney *et al.*, 2021). Por outro lado, ao observarmos a expressão proteica de ACE-2 nas células pré-tratadas, vemos que a expressão aumentada do mRNA não refletiu no aumento da tradução dessa proteína, se apresentando bem similar aos outros tratamentos, mesmo quando utilizamos o anticorpo capaz de detectar as

outras isoformas de ACE-2. A discordância da expressão do transcrito de ACE-2 em HBMECs estimuladas com IFN- $\beta$  para a expressão proteica na mesma condição, pode ser explicada pela recém-descoberta descrita na literatura de que o IFN- $\beta$  é capaz de induzir expressão de ACE-2, mas não necessariamente a isoforma com domínio responsável pela ligação do SARS-CoV-2 na célula (Onabajo *et al.*, 2022). Da mesma forma, não observamos mudança da infecção de SARS-CoV-2 nas HBMECs pré-ativadas com os estímulos pró-inflamatórios.

Como a pré-ativação das HBMECs não foi bem sucedida em promover o aumento da expressão dos receptores virais e em converter a permissividade das células ao vírus, passamos a explorar outros mecanismos para tornar as células permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2. O uso de pseudovírus é amplamente utilizado para realização de “delivery” de genes para células com deficiência na expressão de determinada proteína. No contexto de infecção pelo SARS-CoV-2, diversos grupos de pesquisa desenvolveram pseudovírus de SARS-CoV-2, para o melhor entendimento da infecção do vírus (Crawford *et al.*, 2020; Lei *et al.*, 2020; Nie *et al.*, 2020; Schmidt *et al.*, 2020). Entretanto, a maioria buscava compreender como ocorria adsorção do vírus nas células hospedeiras e, principalmente, realizar ensaios de neutralização da proteína S viral. Já para o desenvolvimento de modelo de estudo de células endoteliais de microvasculatura *in vitro*, um trabalho na literatura demonstra que células endoteliais primárias que, antes não eram infectadas pelo SARS-CoV-2, ao transduzirem ACE-2 para as células através do uso de vetor lentiviral, as CEs de diferentes tecidos passam a ser produtivamente infectadas pelo vírus (Conde *et al.*, 2022). Aqui neste trabalho utilizamos da mesma ferramenta de vetor lentiviral carreador do gene da ACE-2 humana para superexpressar essa proteína nas HBMECs. Primeiramente, confirmamos que a infecção de HBMECs com P-ACE-2 levou ao aumento da expressão do receptor viral.

Uma etapa crucial do desenvolvimento do estudo utilizando o vetor lentiviral foi a cinética da viabilidade das HBMECs infectadas com diferentes diluições de P-ACE-2 e a cinética da expressão de ACE-2 nas células. Observamos que concentrações elevadas de P-ACE-2, as condições de diluição 1:1 e 1:2, podem ser tóxicas para as células após um longo período de infecção (48-72h). Nessas mesmas condições, ainda era possível observar expressão de ACE-2 nas células. Como o ensaio de viabilidade é realizado em placas de 96 poços e a cinética da expressão proteica de ACE-2 em placas de 24 poços, os volumes utilizados entre os experimentos foram diferentes. Por isso nós realizamos uma normalização pela concentração da proteína p24Gag de HIV nos estoques de P-ACE-2 através de ensaio de ELISA, assim, pudemos saber o quanto de P-ACE-2 foi utilizado proporcionalmente em ambos experimentos e pudemos determinar que a diluição ideal de uso seja entre 4 a 6 vezes para que não provoque

efeito citopático nas HBMECs, mas ainda promova a expressão de ACE-2 nas células após as 72h de experimento.

Após padronizarmos o constructo a ser utilizado, bem como o volume e o tempo de infecção não tóxicos, avaliamos se as células eram susceptíveis e permissivas a SARS-CoV-2 nessas condições. Observamos que HBMECs expressando ACE-2 apresentaram mais cópias de RNA genômico intracelular, especialmente para variante RJ1 que apresentou diferença significativa, quando comparado à infecção de células selvagens. Apesar das demais variantes não apresentarem diferença estatisticamente significativa, o aumento da expressão de RNA genômico de todos os isolados infectando HBMECs que superexpressam ACE-2, é nítido. Esse aumento está associado a maior capacidade do vírus de infectar as células, agora que elas superexpressam seu receptor, mas como já havíamos observado baixas quantidades de ACE-2 e de CD147, também é possível detectar presença do genoma nas células sem P-ACE-2. Condizente com isso, o RNA subgenômico dos vírus que infectaram as células superexpressando ACE-2, apresenta aumento ao longo do tempo, demonstrando replicação produtiva. A diferença mais clara nesse experimento foi para variante omicron, em que não detectamos a expressão de RNA subgenômico nas células sem P-ACE-2 e, quando passam a superexpressar ACE-2, passamos a observar a presença e aumento de sua expressão. O mesmo aumento do número de cópias de RNA genômico também foi observado no meio extracelular, ao compararmos a infecção entre ambas as células. Mais uma vez, a diferença estatística foi observada apenas na variante RJ1, apesar de todas as variantes terem demonstrado aumento. Somado a isso, ao repetirmos o ensaio de plaque, comparando a liberação de partículas infecciosas entre ambas as células, vimos que as células superexpressando o receptor viral obtiveram a formação de placas de lise após 24h de infecção e ainda mais acentuada após as 48h de experimento, corroborando com os dados anteriores. Curiosamente, a expressão da proteína N viral foi observada apenas nas células infectadas com RJ1 ou delta. A ausência da detecção da proteína N viral nas células infectadas com omicron pode ser associado aos dados na literatura que sugerem que a ciclagem dessa variante seja mais lenta, o que também foi observada ao analisarmos o RNA genômico e subgenômico anteriormente. Suzuki e colaboradores (2022) demonstraram que a variante omicron apresenta infectividade e patogenicidade atenuada em modelos de hamster, quando comparado ao vírus selvagem. Assim como em estudo de casos clínicos, no qual pacientes infectados com a variante omicron apresentaram viremia reduzida e menos sintomas fora do trato respiratório (Kirca *et al.*, 2022). Além disso, outra informação que este experimento nos fornece é em relação a expressão de ACE-2 nas células após 24 e 48h de infecção. Podemos observar que após 24h de experimento

as HBMECs infectadas com P-ACE-2 tem forte expressão dessa proteína, o que não se manteve após 48h do experimento. Isso porque, de acordo com a literatura, a ligação do vírus com a ACE-2 promove a internalização do receptor (Jackson *et al.*, 2022) e, já que as HBMECs não o expressa em grande quantidade, não ocorre a ciclagem dessa proteína nas células e a sua expressão é limitada. Outro dado importante de se destacar neste experimento é que, mesmo nas células selvagens, sem a infecção prévia com P-ACE-2, podemos observar a presença de ACE-2 em baixas quantidades, assim como o observado em experimentos anteriores. Isso se deve provavelmente à alta concentração das amostras utilizadas, sendo possível detectar a proteína nas células, mas não sendo o suficiente para sustentar a infecção produtiva das HBMECs. Com essa gama de experimentos, nós pudemos concluir que as HBMECs superexpressando ACE-2 passam a ser produtivamente infectadas pelo SARS-CoV-2.

Por fim, como nosso intuito é entender o envolvimento das células endoteliais no agravamento da COVID-19, verificamos a ativação das HBMECs pelos níveis de expressão de mediadores inflamatórios. Tanto as células infectadas com RJ, quanto as células infectadas com omicron demonstraram aumento significativo da expressão de IL-8 após 48h de infecção, independente da presença de ACE-2. Como não observamos modulação alguma da variante delta, contrariando resultados anteriores do nosso grupo, urge a necessidade de repetição dos experimentos, bem como a realização de ensaios utilizando partículas virais inativadas para confirmar esses achados. Além disso, para acrescentar ao estudo, será necessário a realização de experimentos futuros para investigar o impacto na permeabilidade das HBMECs superexpressando ACE-2 e infectadas com SARS-CoV-2. Assim, com os dados apresentados, podemos compreender a importância da presença de ACE-2 para infecção de células endoteliais de microvasculatura pelo SARS-CoV-2 e concluir que a ferramenta empregada para superexpressão dessa proteína nas células é um ótimo caminho para estudar a infecção dessas células e as consequências para a COVID-19. O presente trabalho pode contribuir para o entendimento dos efeitos da infecção do SARS-CoV-2, não só para compreender as consequências no sistema nervoso central, mas também para estudar a endotelite resultante da COVID-19.

## 7. CONCLUSÃO

- 7.1. As HBMECs expressam baixos níveis de ACE-2 e não são produtivamente infectadas pelo SARS-CoV-2 *in vitro*.

- 7.2.** A construção de um vetor lentiviral carreando o mRNA da ACE-2 humana foi eficiente em levar a superexpressão de ACE-2 nas HBMECs.
- 7.3.** As HBMECs superexpressando ACE-2 tornam-se permissivas à infecção pelo SARS-CoV-2, evidenciado pelo aumento dos níveis de RNA genômico intra e extracelular em relação às HBMECs selvagens e pela presença de partículas infecciosas no meio extracelular.
- 7.4.** HBMECs são ativadas pela interação com o SARS-CoV-2, levando ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios, independente da superexpressão de ACE-2.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, Maximilian; VERLEDEN, Stijn E.; KUEHNEL, Mark; *et al.* Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 2, p. 120–128, 2020.
- ALMADHI, Marwa Ali; ABDULRAHMAN, Abdulkarim; SHARAF, Sayed Ali; *et al.* The high prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection reveals the silent spread of COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 656–661, 2021.
- ALQUISIRAS-BURGOS, I. *et al.* Neurological Complications Associated with the Blood-Brain Barrier Damage Induced by the Inflammatory Response During SARS-CoV-2 Infection. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 520–535, 2021.
- AMRAEI, Razie; YIN, Wenqing; NAPOLEON, Marc A.; *et al.* CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2. **bioRxiv**, p. 2020.06.22.165803, 2021.
- BEHZAD, Shima; AGHAGHAZVINI, Leila; RADMARD, Amir Reza; *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19: Radiologic and clinical overview. **Clinical Imaging**, v. 66, p. 35–41, 2020.
- LIBLUME, Cornelia; JACKSON, Claire L.; SPALLUTO, Cosma Mirella; *et al.* A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection. **Nature Genetics**, v. 53, n. 2, p. 205–214, 2021.
- CEVIK, Muge; KUPPALLI, Krutika; KINDRACHUK, Jason; *et al.* Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **BMJ**, v. 371, p. m3862, 2020.

CHAN, Jasper Fuk-Woo; KOK, Kin-Hang; ZHU, Zheng; *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020.

CHAN, Jasper Fuk-Woo; YUAN, Shuofeng; KOK, Kin-Hang; *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 514–523, 2020.

CHEN, Nanshan; ZHOU, Min; DONG, Xuan; *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020.

COELHO, Sharton Vinícius Antunes. Ativação sistêmica do sistema caliceína-cinina na dengue e na COVID-19: possíveis implicações fisiopatológicas da sinalização de receptores endoteliais de bradicinina. 2022. 373 f. Tese (Doutorado) - Curso de Imunologia e Inflamação, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

CRAWFORD, K. H. D. *et al.* Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 513, 6 maio 2020.

DAUPHINEE, Shauna M; KARSAN, Aly. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 1, p. 9–22, 2006.

DE HAAN, Cornelis A. M.; VENNEMA, Harry; ROTTIER, Peter J. M. Assembly of the Coronavirus Envelope: Homotypic Interactions between the M Proteins. **Journal of Virology**, v. 74, n. 11, p. 4967–4978, 2000.

DEL VALLE, Diane Marie; KIM-SCHULZE, Seunghee; HUANG, Hsin-Hui; *et al.* An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020.

DENG, Sheng-Qun; PENG, Hong-Juan. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 575, 2020.

DESAI, Tina R.; LEEPER, Nicholas J.; HYNES, Karen L.; *et al.* Interleukin-6 Causes Endothelial Barrier Dysfunction via the Protein Kinase C Pathway. **Journal of Surgical Research**, v. 104, n. 2, p. 118–123, 2002.

FINNEY, Lydia J.; GLANVILLE, Nicholas; FARNE, Hugo; *et al.* Inhaled corticosteroids downregulate the SARS-CoV-2 receptor ACE2 in COPD through suppression of type I interferon. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 2, p. 510-519.e5, 2021.

FISHER, Dale; HEYMANN, David. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. **BMC Medicine**, v. 18, p. 57, 2020.

FOSSE, J. H. *et al.* Endothelial Cells in Emerging Viral Infections. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 619690, 24 fev. 2021.

LIGIERER, Stefanie; BERTRAM, Stephanie; KAUP, Franziska; *et al.* The Spike Protein of the Emerging Betacoronavirus EMC Uses a Novel Coronavirus Receptor for Entry, Can Be Activated by TMPRSS2, and Is Targeted by Neutralizing Antibodies. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5502–5511, 2013.

GHEBLAWI, M. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System. **Circulation Research**, v. 126, n. 10, p. 10.1161/CIRCRESAHA.120.317015, 8 maio 2020.

GONG, Jing; DONG, Hui; XIA, Qing-Song; *et al.* Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, p. 963, 2020.

GORBALENYA, Alexander E.; ENJUANES, Luis; ZIEBUHR, John; *et al.* Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p. 17–37, 2006.

Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020 Jan 24;12(2):135. doi: 10.3390/v12020135. PMID: 31991541; PMCID: PMC7077245. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7077245/>

HAMMING, I; TIMENS, W; BULTHUIS, MLC; *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.

HATTORI, Y. *et al.* Vascular endotheliitis associated with infections: Its pathogenetic role and therapeutic implication. **Biochemical Pharmacology**, v. 197, p. 114909, mar. 2022.

**Healthcare Workers.** Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html>. Acesso em: 15 jun. 2023.

HIKMET, F. *et al.* The protein expression profile of ACE2 in human tissues. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 7, p. e9610, 26 jul. 2020.

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; SCHROEDER, Simon; *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 2020.

HUANG, Chaolin; WANG, Yeming; LI, Xingwang; *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 2022.

Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, Farzan M, Wohlford-Lenane C, Perlman S, McCray PB Jr. ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14614-21. doi: 10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005.

JIN, Y. *et al.* Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, p. 293, 24 dez. 2020

- KIRCA, F. et al. Comparison of clinical characteristics of wild-type SARS-CoV-2 and Omicron. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 68, n. 10, p. 1476–1480, [s.d.].
- KLOK, F.A.; KRUIP, M.J.H.A.; VAN DER MEER, N.J.M.; *et al.* Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. **Thrombosis Research**, v. 191, p. 148–150, 2020.
- LEI, C. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. **Nature Communications**, v. 11, p. 2070, 24 abr. 2020.
- LEVI, Marcel; THACHIL, Jecko; IBA, Toshiaki; *et al.* Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. **The Lancet. Haematology**, v. 7, n. 6, p. e438–e440, 2020.
- LI, Qun; GUAN, Xuhua; WU, Peng; *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020.
- LIANG, Weicheng; FENG, Zhijie; RAO, Shitao; *et al.* Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. **Gut**, v. 69, n. 6, p. 1141–1143, 2020.
- LU, Roujian; ZHAO, Xiang; LI, Juan; *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.
- MADDEN, Emily A; DIAMOND, Michael S. Host cell-intrinsic innate immune recognition of SARS-CoV-2. **Current Opinion in Virology**, v. 52, p. 30–38, 2022.
- MADGE, Lisa A.; POBER, Jordan S. TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 70, n. 3, p. 317–325, 2001.
- MAGRO, Giuseppe. SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the ‘culprit lesion’ of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? SGP130Fc. **Cytokine**, v. 2, n. 2, p. 100029, 2020.
- MANIK, Moumita; SINGH, Rakesh K. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 3, p. 869–877, 2022.
- MAO, Ling; JIN, Huijuan; WANG, Mengdie; *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurology**, v. 77, n. 6, p. 1–9, 2020.
- MONTEIL, V. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 905–913.e7, 14 maio 2020.
- MUKHRA, Richa; KRISHAN, Kewal; KANCHAN, Tanuj. Possible modes of transmission of Novel Coronavirus SARS-CoV-2: a review. **Acta Bio Medica : Atenei Parmensis**, v. 91, n. 3, p. e2020036, 2020.
- NADER, D. et al. SARS-CoV-2 uses major endothelial integrin  $\alpha\beta3$  to cause vascular dysregulation in-vitro during COVID-19. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6, p. e0253347, 23 jun. 2021.

**Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it.** Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>. Acesso em: 17 jun. 2023.

NASCIMENTO CONDE, J. et al. Recombinant ACE2 Expression Is Required for SARS-CoV-2 To Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses. **mBio**, v. 11, n. 6, p. e03185-20, 11 dez. 2020.

NIE, J. et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 680–686, 24 mar. 2020.

NIETHAMER, T. K. et al. Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury. **eLife**, v. 9, p. e53072, [s.d.].

NG, Kevin W.; ATTIG, Jan; BOLLAND, William; *et al.* Tissue-specific and interferon-inducible expression of non-functional ACE2 through endogenous retroelement co-option. **Nature genetics**, v. 52, n. 12, p. 1294–1302, 2020.

**OMS declara fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/5-5-2023-oms-declara-fim-da-emergencia-saude-publica-importancia-internacional-referente>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

PELAIA, Corrado; TINELLO, Caterina; VATRELLA, Alessandro; *et al.* Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 14, p. 1753466620933508, 2020.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439–450, 2009.

PIERA-VELAZQUEZ, S.; JIMENEZ, S. A. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1281–1324, 1 abr. 2019.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803–815, out. 2007.

PONS, Stéphanie; FODIL, Sofiane; AZOULAY, Elie; *et al.* The vascular endothelium: the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. **Critical Care**, v. 24, p. 353, 2020.

Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.

ROTHSTEIN, Aaron; OLDRIDGE, Olivia; SCHWENNESEN, Hannah; *et al.* Acute Cerebrovascular Events in Hospitalized COVID-19 Patients. **Stroke**, p. 10.1161/STROKEAHA.120.030995, 2020.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 380, p. 499–506, 1995.

SCAGNOLARI, Carolina; BITOSSO, Camilla; VISCIDO, Agnese; *et al.* ACE2 expression is related to the interferon response in airway epithelial cells but is that functional for SARS-CoV-2 entry? **Cytokine**, v. 140, p. 155430, 2021.

SNIJDER, Eric J.; VAN DER MEER, Yvonne; ZEVENHOVEN-DOBBE, Jessika; *et al.* Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 80, n. 12, p. 5927–5940, 2006.

STERTZ, Silke; REICHEL, Mike; SPIEGEL, Martin; *et al.* The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 304–315, 2007.

SUZUKI, R. *et al.* Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 700–705, 2022.

TEIJARO, J. R. *et al.* Endothelial Cells Are Central Orchestrators of Cytokine Amplification during Influenza Virus Infection. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 980–991, 16 set. 2011.

TEUWEN, L.-A. *et al.* COVID-19: the vasculature unleashed. **Nature Reviews. Immunology**, v. 20, n. 7, p. 389–391, 2020.

The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

THORNE, Lucy G; REUSCHL, Ann-Kathrin; ZULIANI-ALVAREZ, Lorena; *et al.* SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 15, p. e107826, 2021.

TUNÇ, Abdulkadir; ÜNLÜBAŞ, Yonca; ALEMDAR, Murat; *et al.* Coexistence of COVID-19 and acute ischemic stroke report of four cases. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 77, p. 227–229, 2020.

VARGA, Zsuzsanna; FLAMMER, Andreas J; STEIGER, Peter; *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2020.

**Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2 | The BMJ.** Disponível em: <<https://www.bmj.com/content/371/bmj.m3862.long>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

**Viruses | Free Full-Text | Return of the Coronavirus: 2019-nCoV.** Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/2/135>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

WANG, J. *et al.* Dysfunctional Coagulation in COVID-19: From Cell to Bedside. **Advances in Therapy**, v. 37, n. 7, p. 3033–3039, 2020a.

WANG, K. *et al.* CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, p. 283, 4 dez. 2020b.

WANG, Yuhang; PERLMAN, Stanley. COVID-19: Inflammatory Profile. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 65–80, 2022.

**Weekly epidemiological update on COVID-19 - 11 May 2023.** Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---11-may-2023>>.

Acesso em: 17 jun. 2023.

WICHMANN, Dominic; SPERHAKE, Jan-Peter; LÜTGEHETMANN, Marc; *et al.* Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19. **Annals of Internal Medicine**, p. M20-2003, 2020.

World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard., Last updated: March 10, 2023

WU, Fan; ZHAO, Su; YU, Bin; *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.

WU, Hung-Yi; BRIAN, David A. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12257–12262, 2010.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239–1242, 2020.

YANG, R.-C. *et al.* SARS-CoV-2 productively infects human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, p. 149, 15 jun. 2022.

YANG, Xiaobo; YU, Yuan; XU, Jiqian; *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 8, n. 5, p. 475–481, 2020.

ZAKI, S. R. *et al.* Hantavirus Pulmonary Syndrome. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 3, p. 552–579, mar. 1995.

ZHANG, Jin-jin; DONG, Xiang; CAO, Yi-yuan; *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1730–1741, 2020.

ZHANG, Yong-Zhen; HOLMES, Edward C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 223–227, 2020.

ZHU, Na; ZHANG, Dingyu; WANG, Wenling; *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

ZIEGLER, Carly G.K.; ALLON, Samuel J.; NYQUIST, Sarah K.; *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1016-1035.e19, 2020.