

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLOGIA

ANTONIELLE RODRIGUES PEREIRA ALVES

**INFECÇÃO POR BETA CORONAVIRUS DESENCADEIA DISFUNÇÃO
VASCULAR, FALÊNCIA CIRCULATÓRIA E MORTE EM CAMUNDONGOS VIA
TNF/NF- κ B/iNOS**

BELO HORIZONTE

2022

ANTONIELLE RODRIGUES PEREIRA ALVES

**INFECÇÃO POR BETA CORONAVIRUS DESENCADEIA DISFUNÇÃO
VASCULAR, FALÊNCIA CIRCULATÓRIA E MORTE EM CAMUNDONGOS VIA
TNF/NF- κ B/iNOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia (PPGFisFar), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para obtenção do grau em Mestre em fisiologia.

Orientadora: Profa Dra. Virgínia Soares Lemos.

BELO HORIZONTE

2022

043

Alves, Antonielle Rodrigues Pereira.

Infecção por beta coronavirus desencadeia disfunção vascular, falência circulatória e morte em camundongos via TNF/NF-κB/iNOS [manuscrito] / Antonielle Rodrigues Pereira Alves. – 2022.

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

Orientador: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos.

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

1. Fisiologia. 2. COVID-19. 3. SARS-CoV-2. 4. Betacoronavirus. 5. Camundongos. 6. Choque. 7. Estresse oxidativo. I. Lemos, Virgínia Soares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Nº 564 DE ANTONIELLE RODRIGUES PEREIRA ALVES

**"A Infecção por Betacoronavírus Desencadeia Disfunção Vascular,
Falência Circulatória e Morte em Camundongos Via TNF/NF- κ B/iNOS"**

ANTONIELLE RODRIGUES PEREIRA ALVES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **22 de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Roger Lyrio dos Santos, CCS/UFES

Prof. Dr. Luciano Fonseca Lemos de Oliveira, ICS/UFTM

Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 22 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Fonseca Lemos de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 23/12/2022, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgínia Soares Lemos, Professora do Magistério Superior**, em 25/12/2022, às 20:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roger Lyrio dos Santos, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1970733** e o código CRC **45ACEB0C**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos.

Ao meu marido, Gabriel Silva, obrigada por tanto acreditar em mim, por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência e compreensão.

A minha família, por todo o apoio, força e carinho prestado. Aos meus pais, Sra. Ana Maria Alves e Sr. Antônio Alves, que sempre primaram pela minha educação e sempre estiveram presentes. E a minha irmã, Ana Clara pelo companheirismo e por tanto torcer e acreditar em mim.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Virgínia Soares Lemos, pela orientação prestada, pelo apoio, incentivo, disponibilidade, competência, profissionalismo e dedicação tão importantes. Tenho certeza de que não chegaria aqui sem o seu apoio.

Aos meus amigos e parceiros do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Ildernandes Vieira, Natália Muradas, Leda Coimbra, Tales Leonardo, Ana Luysa Lopes e João Salatiel que me auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em todos os momentos.

Ao prof. Steyner Cortes pelos ensinamentos e por ter me acolhimento no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Aos professores Leda Quércia, Lucíola Barcelos, Mauro Teixeira, Vivian Costa e alunos, Larisse Lacerda, Celso Queiroz pela parceria estabelecida ao longo de todo o projeto.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-reitora em Pesquisa, pelo suporte financeiro.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, a mim, ao meu esposo Gabriel, aos meus pais Ana Maria e Antônio, e à minha irmã Ana Clara.

RESUMO

Evidências científicas indicam que o SARS-CoV-2 afeta o sistema cardiovascular, levando a resultados clínicos insatisfatórios. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos subjacentes às disfunções vasculares, alterações hemodinâmicas associadas e letalidade não são compreendidos. Assim, pretendemos investigar os mecanismos envolvidos na disfunção vascular induzida pela infecção pelos betacoronavírus MHV-3 e SARS-Cov-2. Camundongos C57BL/6, iNOS^{-/-}, gp91phox^{-/-} e TNFR1^{-/-} do tipo selvagem foram infectados com MHV-3 e camundongos transgênicos K18-hACE2 com SARS-CoV-2, por instilação nasal. A aorta torácica, a artéria mesentérica e a veia cava inferior foram utilizadas para experimentos de reatividade vascular. A imunofluorescência foi usada para estudar a expressão de proteínas-alvo associadas à inflamação e dano tecidual. A pletismografia em spray e o Doppler foram usados para avaliar a pressão arterial sistólica (PAS) e o fluxo, respectivamente. A quantificação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada usando sondas fluorescentes (DAF e DHE, respectivamente). O ELISA foi usado para avaliar a produção de citocinas inflamatórias. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier. Em camundongos selvagens, a infecção por MHV3 induziu uma diminuição na resposta contrátil à fenilefrina na aorta e na veia cava, que foi associada à diminuição da pressão arterial e do fluxo sanguíneo e à morte. Por outro lado, a contratilidade nas artérias mesentéricas de resistência foi aumentada. Na aorta, a remoção do endotélio, inibição farmacológica da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) com 1400w, deleção genética da iNOS (iNOS^{-/-}) e eliminação do NO com carboxi-PTIO normalizaram a resposta contrátil. A resposta relaxante dependente do endotélio à acetilcolina na aorta foi diminuída pela infecção por MHV-3. A eliminação de ânions superóxido com tiron e deleção genética da subunidade gp91phox da NADPH oxidase (gp91phox^{-/-}) restaurou a vasodilatação. A instilação nasal de MHV-3 resultou em infecção direta da aorta, e a produção de TNF foi aumentada tanto no plasma quanto no tecido vascular. As expressões de iNOS e NF-κB, e a produção basal de NO e ROS, foram aumentadas na infecção por MHV-3 e SARS-CoV-2. A infecção por MHV-3 de animais TNFR1^{-/-} preveniu disfunções vasculares, alterações hemodinâmicas, as expressões de iNOS e NF-κB e a produção basal de NO e ROS, e a morte foram aumentadas por infecção por MHV-3 e SARS-CoV-2. Em conclusão, a infecção pulmonar por beta coronavírus desencadeia uma diminuição aguda dependente do endotélio na contratilidade em grandes artérias e veias, o que leva à insuficiência circulatória e à morte por um mecanismo dependente de TNF/NF-κB/iNOS. A infecção por coronavírus beta também induz o estresse oxidativo associado à diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio via TNF/gp91phox/superóxido. O último mecanismo é uma característica fisiopatológica comum das principais comorbidades associadas à COVID-19 e pode explicar muitas das manifestações clínicas das condições pós-COVID.

Palavras-chave: COVID-19, MHV-3, SARS-CoV-2, disfunção vascular, TNF/NF-κB/iNOS, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Scientific evidence indicates that SARS-CoV-2 affects the cardiovascular system, leading to unsatisfactory clinical outcomes. However, the pathophysiological mechanisms underlying vascular dysfunctions, and associated hemodynamic alterations and lethality, are not understood. Thus, we aim at investigating the mechanisms involved in the vascular dysfunction induced by the infection with the betacoronavirus MHV-3 and SARS-CoV-2. Wild-type C57BL/6, iNOS^{-/-}, gp91phox^{-/-}, and TNFR1^{-/-} mice were infected with MHV-3, and K18-hACE2 transgenic mice with SARS-CoV-2, by nasal instillation. The thoracic aorta, mesenteric artery, and inferior vena cava were used for vascular reactivity experiments. Immunofluorescence was used to study expression of target proteins associated with inflammation and tissue damage. Spray plethysmography and Doppler were used to assess systolic blood pressure (SBP) and flow, respectively. Quantification of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production was performed using fluorescent probes (DAF and DHE, respectively). ELISA was used to assess inflammatory cytokine production. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method. In wild-type mice, MHV3 infection induced a decrease in the contractile response to phenylephrine in the aorta and vena cava, which was associated with decreased arterial blood pressure and blood flow, and death. Conversely, contractility in resistance mesenteric arteries was increased. In the aorta, removal of the endothelium, pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) with 1400w, genetic deletion of iNOS (iNOS^{-/-}), and scavenging of NO with carboxy-PTIO, normalized the contractile response. The endothelium-dependent relaxant response to acetylcholine in the aorta was decreased by MHV-3 infection. Scavenging of superoxide anions with tiron and genetic deletion of the gp91phox subunit of NADPH oxidase (gp91phox^{-/-}) restored vasodilation. Nasal MHV-3 instillation resulted in direct infection of the aorta, and TNF production was increased in both plasma and vascular tissue. The expressions of iNOS and NF-κB, and the basal production of NO and ROS, were increased in MHV-3 and SARS-CoV-2 infection. MHV-3 infection of TNFR1^{-/-} animals prevented vascular dysfunctions, hemodynamics changes, the expressions of iNOS and NF-κB, and the basal production of NO and ROS, and death were increased in MHV-3 and SARS-CoV-2 infection. In conclusion, pulmonary infection with beta coronaviruses triggers an acute endothelium-dependent decrease in contractility in large arteries and veins, which leads to circulatory failure, and death via a TNF/NF-κB/iNOS-dependent mechanism. Beta coronavirus infection also induces oxidative stress associated with decrease in NO-endothelium-dependent vascular relaxation via TNF/gp91phox/superoxide pathway. The latter mechanism is a common pathophysiological feature of the main comorbidities associated with COVID-19 and may explain many of the clinical manifestations of post-covid conditions.

Keywords: COVID-19, MHV-3, SARS-CoV-2, vascular dysfunctions, TNF/NF-κB/iNOS pathway, TNF/gp91phox/superoxide pathway.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Partícula viral e genes gerais dos coronavírus.....	16
FIGURA 2 - O ciclo de vida do SARS-CoV-2.....	19
FIGURA 3 - Patogênese clássica de COVID-19.....	21
FIGURA 4 - A infecção intranasal de camundongos com MHV-3 causa letalidade de 100% até o 6 DPI, mesmo com a saturação de oxigênio preservada.....	42
FIGURA 5 - A infecção por MHV-3 desencadeia disfunção vascular contrátil dependente de endotélio na aorta de camundongos.....	44
FIGURA 6 - Aumento da produção de óxido nítrico na artéria aorta de camundongos infectados com betacoronavírus	46
FIGURA 7 - O NO é responsável pela disfunção contrátil na aorta de camundongos infectados com MHV-3.....	46
FIGURA 8 - A expressão vascular da iNOS está aumentada dos animais infectados com MHV-3.....	48
FIGURA 9 - A expressão vascular da iNOS está aumentada dos animais infectados com SARS-CoV-2.....	49
FIGURA 10 - A iNOS é responsável pela disfunção contrátil na aorta de camundongos infectados com MHV-3.....	50
FIGURA 11 - A infecção com MHV-3 aumenta a produção de ROS na aorta.....	51
FIGURA 12 - A infecção com MHV-3 causa aumento na produção de ROS via NADPH oxidase e consequente causa disfunção no relaxamento vascular da artéria aorta.....	52
FIGURA 13 - A infecção com MHV-3 induz a diminuição da pressão arterial e o aumento da contração vascular na artéria mesentérica.....	53
FIGURA 14 - A infecção por MHV-3 promove diminuição do fluxo sanguíneo.....	55

FIGURA 15 - A infecção pulmonar por MHV-3 aumenta a produção de TNF no plasma e na artéria aorta.....	56
FIGURA 16 - A Infecção pelo MHV-3 induz a expressão do NF-kB na aorta.....	57
FIGURA 17 - A deleção do gene que expressa o receptor TNF1 (TNFR1 ^{-/-}) previne a mortalidade e o aumento na expressão do NF-kB pelo MHV-3.....	58
FIGURA 18 - A deleção gênica do receptor TNF1 (TNFR1 ^{-/-}) previne o aumento da produção de NO vascular e da expressão da iNOS induzida pela infecção com o MHV 3.....	60
FIGURA 19 - A supressão gênica do receptor TNF1 (TNFR1 ^{-/-}) previne o estresse oxidativo e a consequente disfunção do relaxamento vascular na aorta.....	61
FIGURA 20 - A deleção gênica do receptor 1 do TNF previne a diminuição do fluxo sanguíneo periférico causa pela infecção por MHV-3.....	63
FIGURA 21 - Relação pressão e diminuição do raio segundo as leis de mecânica de fluidos.....	65
FIGURA 22 - Relação fluxo e raio segundo as leis de mecânica de fluidos.....	66
FIGURA 23 – Gráfico abstract.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - O MHV-3 infecta a aorta e artérias mesentéricas de camundongos.....	43
GRÁFICO 2 - A infecção com MHV-3 induz diminuição da contração vascular na veia cava.....	54
GRÁFICO 3 - O deleção gênica do receptor TNF1 (TNFR1 ^{-/-}) previne a disfunção contrátil na aorta provocada pela infecção com o MHV-3.....	59
GRÁFICO 4 - A suspensão genética do receptor TNF1 (TNFR1 ^{-/-}) evitou a disfunção vascular contrátil na veia cava.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A.U. - Unidades arbitrárias

ACh - Acetilcolina

CEV - Célula endotelial vascular

DAF - 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato

DHE - Diidroetídio

DPI - Dias pós-inoculação

ECA2 - Enzima de conversão de angiotensina 2

EPM. – Erro padrão da média

iNOS - Óxido nítrico sintase citocina-induzível

MERS-CoV - Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio

MHV - Vírus da Hepatite Murina

NF-kB - Fator nuclear kappa B

NO - Óxido nítrico

PAS - Pressão arterial sistólica

Fen - Fenilefrina

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SARS - Síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave

TMPRSS2 - Protease transmembrana serina 2

TNF - Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 OS CORONAVÍRUS	15
1.2. PANORAMA HISTÓRICO DAS CORONAVIROSES	16
1.3 O CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE 2....	17
1.3.1 SARS-CoV-2, o ciclo de vida viral e desenvolvimento clássico da COVID-19	18
1.3.2 A COVID-19 extrapulmonar e o acometimento do sistema vascular	22
<u>1.3.2.1 O endotélio vascular e suas funções fisiológicas</u>	22
1.3.2.1.1 O papel do NO na vasodilatação vascular	24
<u>1.3.2.2 O endotélio vascular e suas possíveis contribuições para a patogênese da COVID-19</u>	26
1.4 MODELO DE ESTUDO	27
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 ANIMAIS	34
4.2 VÍRUS	34
4.3 INFECÇÃO POR MHV-3 E SARS-COV-2	34
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INFECÇÃO POR INSTILAÇÃO NASAL POR MHV-3 SOBRE A MORTALIDADE E SOBRE A SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO	35
4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	35
4.6 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DIRETA DOS VASOS PELO MHV-3 POR TITULAÇÃO VIRAL	35
4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR	36
4.7.1 Artéria aorta	36
4.7.2 Artéria mesentérica de segunda ordem	37
4.7.3 Veia cava inferior	38

4.8 AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NAS DISFUNÇÕES VASCULARES CAUSADAS PELA INFECÇÃO POR MHV-3 E SARS-COV-2.....	39
4.8.1 Avaliação <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico e de espécies de oxigênio na artéria aorta por sondas fluorescentes.....	39
4.8.2 Avaliação <i>in situ</i> da expressão de iNOS e NF-kB na artéria aorta por imunofluorescência.....	39
4.8.3 ELISA.....	40
4.9 AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA INFECÇÃO POR MHV-3 SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL.....	40
4.10 AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA INFECÇÃO POR MHV-3 SOBRE PERFUSÃO SANGUÍNEA.....	41
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5 RESULTADOS	42
5.1 A INFECÇÃO INTRANASAL DE CAMUNDONGOS PELO MHV-3 RESULTA EM LETALIDADE DE 100% ATÉ O 6DPI, MESMO COM A SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO PRESERVADA.....	42
5.2 O MHV-3 INFECTA A ARTÉRIA AORTA E ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS.....	42
5.3 A INFECÇÃO POR MHV-3 DESENCADEIA DISFUNÇÃO VASCULAR CONTRÁTIL DEPENDENTE DE ENDOTÉLIO NA AORTA DE CAMUNDONGOS.....	43
5.4 A PRODUÇÃO DE NO VIA iNOS É A RESPONSÁVEL PELA DIMINUIÇÃO DA CONTRATILIDADE AÓRTICA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O MHV-3	45
5.5 A INFECÇÃO POR MHV-3 AUMENTA A PRODUÇÃO DE ROS VIA NADPH OXIDASE QUE INDUZ DISFUNÇÃO DE RELAXAMENTO DA AORTA.....	51
5.6 EFEITO DA INFECÇÃO COM MHV-3 NA CONTRATILIDADE DA VEIA CAVA, ARTÉRIA MESENERICA E PARAMETROS HEMODINÂMICOS.....	53

5.7 AS DISFUNÇÕES VASCULARES E AS REPERCUSSÕES SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FLUXO SANGUÍNEO CAUSADAS PELA INFECÇÃO DO MHV-3, SÃO MEDIADOS POR TNF.....	55
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OS CORONAVÍRUS

Os coronavírus englobam uma grande família viral. Eles são caracterizados por serem partículas envelopadas e esféricas com 100 a 160 nm de diâmetro, cujo material genético consiste em uma fita simples de RNA de sentido positivo (**FIGURA 1**) (ZAKI et al., 2012; CUI, LI, SHI, 2019; SHE et al., 2020; ANDRADE et al., 2021; PERICO et al., 2021). Os coronavírus são considerados vírus fenotipicamente e genotipicamente diversos, pertencem a ordem *Nidovirales*, a família *Coronaviridae* e são divididos em quatro gêneros distintos: alfacoronavírus e betacoronavírus, que infectam exclusivamente mamíferos, gamacoronavírus e deltacoronavírus, os quais têm uma ampla gama de hospedeiros (CUI, LI, SHI, 2019; ANDRADE et al., 2021; V'KOVSKI, et al., 2021). Embora sejam amplamente distribuídos, os coronavírus são frequentemente encontrados em morcegos, podendo também estar presentes em pássaros, gatos, cães, porcos, camundongos, cavalos e baleias (ZAKI et al., 2012; SHE et al., 2020). A eles, estão associadas doenças respiratórias, gastroenterites e acometimento hepático e neurológico, com gravidade variável (ZAKI et al., 2012; CUI, LI, SHI, 2019; SHE et al., 2020).

Os coronavírus possuem um RNA notavelmente grande, o qual codifica proteínas não estruturais, acessórias e estruturais. As não estruturais compõem o complexo de replicação e transcrição viral, são responsáveis pelo processamento, modificação e revisão do RNA genômico. As proteínas acessórias, contribuem principalmente para modular a resposta do hospedeiro à infecção, assim sendo são determinantes para a patogenicidade do vírus (CUI, LI, SHI, 2019; V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). E dentre as proteínas estruturais, encontram-se a proteína spike, a proteína envelope, a proteína de membrana e a proteína de nucleocapsídeo (**FIGURA 1**) (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). O RNA é encapsulado pelas proteínas do nucleocapsídeo, enquanto as proteínas de membrana e do envelope asseguram sua incorporação na partícula viral, durante o processo de montagem (V'KOVSKI, et al., 2021). As proteínas spike projetam-se do envelope viral e são responsáveis por promover a entrada do vírus dentro da célula (V'KOVSKI, et al., 2021). Elas são consideradas glicoproteínas de fusão homotriméricas, sendo divididas em dois segmentos funcionais distintos, S1 e S2 (CUI, LI, SHI, 2019; V'KOVSKI, et al., 2021). A fração S1 contém o domínio de ligação ao receptor, ficando

de morcego, que tinha como hospedeiro intermediário, civetas (CUI, LI, SHI, 2019; V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021).

O SARS-CoV infectou um total de 8 mil pessoas, tendo sido letal a quase 10% delas. Dano alveolar severo e indução de insuficiência respiratória progressiva foram alguns dos efeitos observados à infecção (DROSTEN, et al., 2003; SHE et al., 2020; V'KOVSKI, et al., 2021). A epidemia começou na Ásia e a maioria dos casos foram registrados na China e na região Ásia-Pacífico, mais especificamente na China continental e em Hong Kong (DROSTEN, et al., 2003; ZHONG et al., 2003; V'KOVSKI, et al., 2021). Por meio de viagens internacionais, a infecção se espalhou por aproximadamente 30 países, como: Vietnã, Canadá, Cingapura, Tailândia, Taiwan e Estados Unidos (DROSTEN, et al., 2003; ZAKI et al., 2012; KSIAZEK et al., 2020). Na época, medidas drásticas de saúde pública foram tomadas, incluindo-se restrições de viagem e isolamento de pacientes infectados, o que impediu que o vírus se espalhasse ainda mais (DROSTEN, et al., 2003; V'KOVSKI, et al., 2021).

Dez anos depois, em 2012, um segundo coronavírus, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) foi associado a lesões pulmonares e manifestações clínicas graves no Oriente Médio, África e Ásia (CUI, LI, SHI, 2019; V'KOVSKI, et al., 2021). Assim como o SARS-CoV, o MERS-Cov se originou de morcegos e estabeleceu um reservatório intermediário em um outro animal, no caso, os camelos dromedários (CUI, LI, SHI, 2019; V'KOVSKI, et al., 2021). O MERS-CoV foi responsável por mais de 2,5 mil casos humanos e apresentou uma taxa de letalidade de quase 36% (SHE et al., 2020; V'KOVSKI, et al., 2021). Após o surto do MERS-CoV, emergiu, em 2019, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2, que ocasionou a doença COVID-19 (SHE et al., 2020; V'KOVSKI, et al., 2021).

1.3 O CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE 2

Inicialmente chamado de 2019-nCoV, o novo coronavírus foi identificado pela primeira vez em Wuhan, província de Hubei, na China (SHE et al., 2020; V'KOVSKI, et al., 2021). Em 31 de dezembro de 2019 a Organização Mundial da Saúde (OMS) registrou o primeiro caso de pneumonia de origem desconhecida (WHO[A], 2022). Nove dias depois as autoridades chinesas, classificaram como surto a infecção causada pelo SARS-CoV-2 e apenas dois dias depois a primeira morte foi registrada (WHO[A], 2022). Cerca de 1 mês após o primeiro caso, a OMS o declarou como

emergência de saúde pública de interesse internacional. Meses depois, em 11 de março de 2020, a doença provocada pelo SARS-CoV-2 foi nomeada como COVID-19 e classificada como pandemia, devido ao nível alarmante de sua disseminação e gravidade (WHO [A], 2022). Quase 100 dias após o primeiro caso de pneumonia, a OMS registrou mais de 1 milhão de casos confirmados em todo o mundo (WHO [A], 2022). Até o dia 07 de novembro de 2022, somam-se mais de 629 milhões de casos confirmados de COVID-19, destes 6,5 milhões evoluíram para óbito (WHO, 2022).

1.3.1 SARS-CoV-2, o ciclo de vida viral e desenvolvimento clássico da COVID-19

A infecção das células hospedeiras se dá partir da interação entre a proteína S do vírus e o seu respectivo receptor celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). Fatores relativos ao próprio hospedeiro, como a presença da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) também contribuem para este processo (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). Logo, rearranjos conformacionais coordenados resultam na fusão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021).

Uma vez dentro de sua célula-alvo, o genoma viral é liberado e ocorre a tradução imediata pelo ribossomo hospedeiro (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). No retículo endoplasmático as poliproteínas resultantes (pp1a e pp1b) são, então, co-traducionalmente e pós-traducionalmente processadas, dando origem a proteínas não estruturais que formam o complexo de replicação e transcrição viral (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). De forma coordenada, as proteínas estruturais são traduzidas e translocadas da membrana do retículo endoplasmático até o complexo de Golgi onde ocorre a montagem do novo vírus e o brotamento de vesículas secretoras (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). Por fim, novas partículas virais são secretadas pela célula, via exocitose (**FIGURA 2**) (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021).

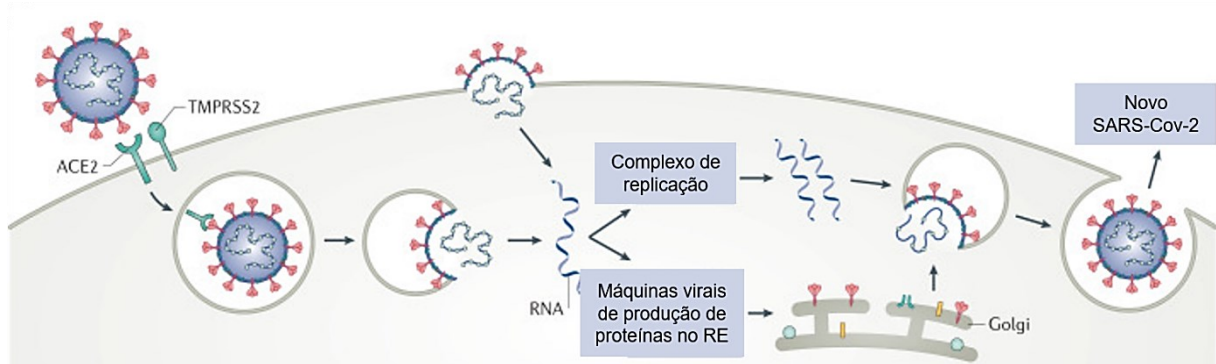


FIGURA 2 - O ciclo de vida do SARS-CoV-2. A entrada do SARS-CoV-2 ocorre a partir da interação entre a proteína S e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Dentro das células-alvo, o SARS-CoV-2 libera o RNA viral no citoplasma para tradução e replicação. As proteínas virais traduzidas são então montadas no retículo endoplasmático (ER) para formar os novos vírus, que são então liberados do sistema de membrana de Golgi por exocitose.

Fonte: Adaptado de PERICO et al., 2021.

No que diz respeito à transmissão, esta ocorre de humano para humano, antes mesmo do início dos sintomas, sendo mediada principalmente por gotículas respiratórias ou aerossóis gerados durante a tosse e o espirro (V'KOVSKI, et al., 2021; PERICO et al., 2021). Na fase inicial da infecção, a entrada do SARS-CoV-2 por inalação é facilitada pela alta expressão de ECA2 e TMPRSS2, na boca, na língua e na mucosa nasal (PERICO et al., 2021). O período de incubação, em geral, varia de 5 a 6 dias, com pico de viremia dentro de 2 a 5 dias após o surgimento dos sintomas (PERICO et al., 2021). A infecção de células do trato respiratório superior, de células epiteliais brônquicas e pneumócitos pode resultar em manifestações clínicas que variam desde infecções assintomáticas ou leves, até inflamação pulmonar aguda grave, com risco de morte (V'KOVSKI, et al., 2021). Em 80% dos casos a doença é leve, os indivíduos apresentam normalmente sintomas inespecíficos modestos, como: febre, fraqueza generalizada e tosse seca, podendo haver também cefaléia e/ou mialgia, que se resolvem espontaneamente em torno de 6 a 10 dias (SHE et al., 2020; LIU et al., 2021; PERICO et al., 2021).

A infecção leve nos pulmões induz a morte de células epiteliais, em particular, pneumócitos tipo II, como parte do ciclo de replicação viral (PERICO et al., 2021). A partir disso, a imunidade inata é ativada e então macrófagos e neutrófilos residentes, por meio de receptores de reconhecimento de padrão intracelular, detectam estruturas de RNA aberrantes e ativam cascatas de sinalização molecular (PERICO et al., 2021). Estas, por sua vez, culminam na ativação de fatores de transcrição, a fim de erradicar o patógeno e matar as células infectadas pelo vírus (PERICO et al., 2021). Ocorre então a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como, interleucina dois e seis (IL-2 e

IL-6), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), interferon-gama (IFN- γ), proteína 10 induzível por IFN γ 10 (IP-10 ou CXCL10), proteína quimioatraente de monócitos 1 e 3 (MCP1 e 3, ou CCL1 e 3), proteína quimioatraente de macrófagos 1 α (MIP 1 α) e o fator de necrose tumoral (TNF) no pulmão, que levam ao recrutamento de leucócitos, propagando ainda mais a resposta inflamatória e estimulando a resposta imune adaptativa (PERICO et al., 2021). Nesta fase, a infiltração de linfócitos (células T CD4+ e T CD8+) e células *natural killer* garantem uma resposta ideal contra o SARS-CoV-2 (PERICO et al., 2021). As células T CD4+ são responsáveis por mediar a produção de anticorpos pelas células B e por aumentar a resposta das células T CD8+ efectoras e *natural killer* (PERICO et al., 2021). A resposta imune orquestrada leva à erradicação viral e a posterior resolução da doença (**FIGURA 3A**) (PERICO et al., 2021).

Já na COVID grave ou moderada (20% dos casos), há a progressão para um desfecho clínico insatisfatório, por razões ainda desconhecidas (PERICO et al., 2021). No entanto, presume-se que esta ocorra principalmente devido à uma predisposição individual e/ou alta carga viral (PERICO et al., 2021). Assim como em casos leves, a imunidade inata é ativada, no entanto, a resposta imune adaptativa na COVID grave, é ineficaz (PERICO et al., 2021). Nesta, observa-se uma diminuição nas células B e uma supressão de células T CD4+, que geram anticorpos ineficazes para a neutralização do SARS-CoV-2 (PERICO et al., 2021). A atividade citotóxica também é prejudicada, o que resulta na liberação viral ininterrupta de novas partículas virais, o que amplifica a ativação de macrófagos e neutrófilos, levando à produção maciça de citocinas (tempestade) (PERICO et al., 2021). O excesso de citocinas e infecção viral persistente leva à doença sistêmica, marcada por danos vasculares, coagulação intravascular disseminada e a falência de órgãos vitais (**FIGURA 3B**) (PERICO et al., 2021).

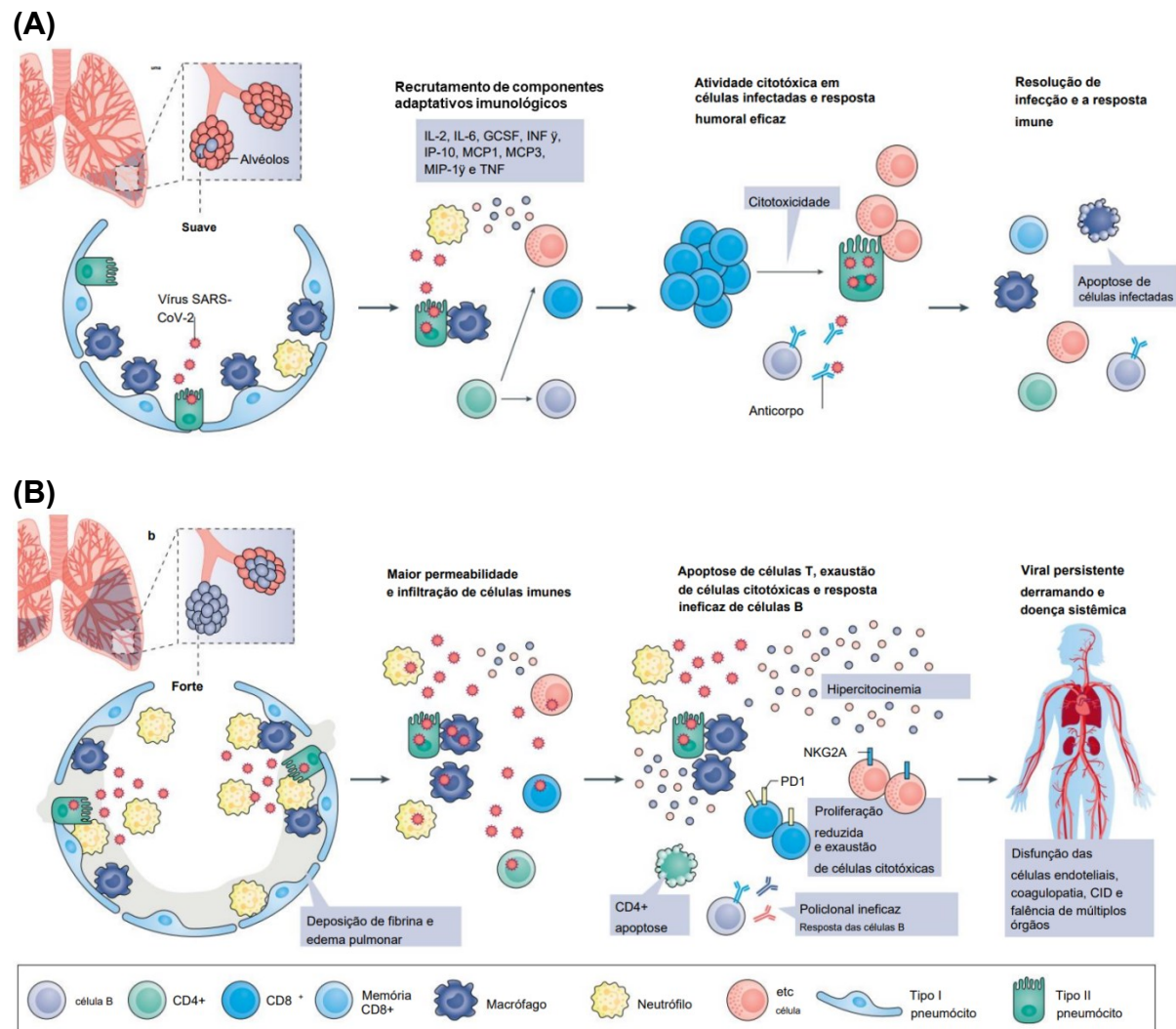


FIGURA 3 – Patogênese da COVID-19. (A) Casos leves. Após infecção dos pulmões, o SARS-CoV-2 induz a quadro de inflamação local que leva ao recrutamento de macrófagos e neutrófilos e com isso a síntese e secreção de citocinas que estimulam a resposta imune adaptativa. Durante a resposta imune adaptativa ocorre a produção de anticorpos, que são responsáveis pela erradicação viral e resolução da doença. (B) Casos graves. A resposta imune adaptativa torna-se ineficaz, nela ocorre a supressão de linfócitos, a produção de anticorpos ineficazes e a exaustão das células T e *natural killer*. A atividade citotóxica prejudicada leva a excreção viral persistente que amplifica a ativação de macrófagos e neutrófilos e a produção maciça de citocinas que leva ao envolvimento sistêmico da COVID-19.

Fonte: PERICO et al., 2021

Assim, embora o pulmão seja o alvo inicial do vírus, um conjunto de evidências traz a disseminação de seus efeitos para outros órgãos, induzindo condições patológicas adicionais (PERICO et al., 2021). Dessa forma, uma maior compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à progressão da doença, poderia auxiliar na identificação de abordagens terapêuticas afim de se atingir diferentes estágios da COVID-19.

1.3.2 A COVID-19 extrapulmonar e o acometimento do sistema vascular

Já se sabe que o pulmão é o órgão primário de acometimento pela COVID-19 (NAGELE et al., 2020; PERICO et al., 2021). Suas células epiteliais, os pneumócitos do tipo II, produzem o surfactante, solução responsável por reduzir a tensão superficial, evitando assim o colapso alveolar (MONTEIL et al., 2020; PERICO et al., 2021). Posto isso, pneumócitos tipo II são células decisivas para a troca gasosa, podendo a disfunção celular causada pelo SARS-CoV-2, explicar a grave lesão pulmonar observada nesses pacientes (MONTEIL et al., 2020). No entanto, a disseminação do vírus para outros órgãos, como, coração, vasos sanguíneos, rins, intestino, cérebro e olhos, induz a manifestações patológicas extrapulmonares (HUERTAS et al., 2020; LIBBY, LUSCHER, 2020; MONTEIL et al., 2020; VARGA et al., 2020; NAGELE et al., 2020; GIORDO et al., 2021; PERICO et al., 2021; QIAN et al. 2021). A infecção generalizada ocorre em virtude do fato de que muitos tipos celulares expressam a ECA2 e TMPRSS2, estando assim vulneráveis à infecção pelo SARS-CoV-2 (HUERTAS et al., 2020; PERICO et al., 2021).

Diante disso, pesquisas e achados histopatológicos em diferentes tecidos revelaram a ocorrência de edema celular, lesão endotelial grave, ruptura de junções intercelulares e perda de contato da membrana basal, o que aponta para a destruição de células endoteliais, endotelite vascular pulmonar e micro trombos capilares alveolares (QIAN et al. 2021). A junção destas evidências sugere a lesão endotelial como marca registrada de danos em múltiplos órgãos, em pacientes com COVID-19 (QIAN et al. 2021). Assim, explorar este tema torna-se um grande interesse para a comunidade científica.

1.3.2.1 O endotélio vascular e suas funções fisiológicas

O endotélio vascular desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase sistêmica, tendo função autócrina e parácrina (GENGE et al., 2019; HUERTAS et al., 2020; VARGA et al., 2020; GIORDO et al., 2021). Além de atuar como barreira permeável entre o sangue e os tecidos, regular seletivamente a permeabilidade endotelial, promover a integridade vascular e permitir o extravasamento de solutos, fluidos, hormônios e macromoléculas, o endotélio também é capaz de regular o seu ambiente, respondendo de forma efetiva à estresses externos, ao liberar uma ampla gama de fatores reguladores (DEANFIELD, HALCOX,

RABELINK, 2007; KRUGER-GENGE et al., 2019; LIBBY, LUSCHER, 2020; GIORDO et al., 2021). Dentre estes fatores, citam-se: as endotelinas, tromboxano A₂, angiotensina II, NO, prostaciclina e outros (KRUGER-GENGE et al., 2019). Com relação aos eventos controlados pela via endotelial, estes incluem o processo de regulação do tônus vascular, da inflamação, do estresse oxidativo, do equilíbrio coagulação/fibrinólise e da adesão celular (KRUGER-GENGE et al., 2019; LIBBY, LUSCHER, 2020; VARGA et al., 2020; GIORDO et al., 2021). Ressalta-se que estas funções são fortemente orquestradas de momento a momento e, para além destas atividades, as células endoteliais vasculares (CEVs) fornecem uma interface crucial nas defesas do hospedeiro (LIBBY, LUSCHER, 2020).

As CEVs formam a linha de frente no encontro com patógenos transportados pelo sangue, sendo responsáveis por detectar possíveis ameaças ao organismo e enviar sinais de alerta precoce sobre infecções ou lesões (LIBBY, LUSCHER, 2020). O endotélio possui um contato prolongado com leucócitos, atuando como sentinela e regulando a entrada destas células nos tecidos (LIBBY, LUSCHER, 2020). Dessa forma, o endotélio participa do combate aos invasores e auxilia no reparo tecidual (LIBBY, LUSCHER, 2020). A interação das CEVs com mediadores leucocitários na imunidade inata e adaptativa, são desprezíveis sob circunstâncias fisiológicas. No entanto, quando moléculas de adesão (selectinas, B-integrinas e imunoglobulinas) são expressas, ocorre adesão leucocitária às células endoteliais e os leucócitos podem atravessar a monocamada endotelial e adentrar os tecidos (LIBBY, LUSCHER, 2020).

Outras funções do endotélio incluem a regulação da oferta tecidual de oxigênio e da demanda metabólica dos tecidos, a partir da sua ação na manutenção do fluxo sanguíneo. Isto porque as CEVs são capazes de modular ativamente o grau de relaxamento e constrição vascular de acordo com a concentração de oxigênio disponível (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007; KRUGER-GENGE et al., 2019). Assim, em coordenação com as células do músculo liso vascular, as CEVs regulam o diâmetro dos vasos, por meio da liberação de fatores relaxantes e de contração vascular (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007; KRUGER-GENGE et al., 2019).

Em condições normais, as CEVs promovem vasodilatação tônica através da síntese e liberação de vasodilatadores endógenos, as substâncias relaxantes dependentes de endotélio (EDRF). Estes promovem o relaxamento da musculatura

lisa, e conseqüentemente, a dilatação dos vasos (VANHOUTTE et al., 2015; KRUGER-GENGE et al., 2019; LIBBY, LUSCHER, 2020). O EDR mais bem caracterizado é o NO que, quando liberado, difunde-se até o músculo liso e é responsável por promover o relaxamento da musculatura lisa, e conseqüente, pelo aumento do diâmetro do vaso sanguíneo (VANHOUTTE et al., 2015; KRUGER-GENGE et al., 2019). O NO não é o único EDRF, sendo exemplos também, os fatores hiperpolarizantes derivado do endotélio (EDH) e a prostaciclina (PGI₂) molécula esta que, além de promover uma vasodilatação potente, tem efeito antiagregante plaquetário (VANHOUTTE et al., 2015; KRUGER-GENGE et al., 2019; LIBBY, LUSCHER, 2020). A modulação da vasomotricidade pelo endotélio não ocorre apenas pela liberação de substância vasodilatadoras, mas também pelo aumento do tônus vasoconstritor através da liberação de substâncias de contração derivados do endotélio (EDCF), como, endotelina-1, prostanóides vasoconstritores e pela conversão de angiotensina I em angiotensina II na superfície endotelial (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007; VANHOUTTE et al., 2015).

1.3.2.1. 1 O papel do NO na vasodilatação vascular

Robert Furchgott foi o farmacêutico demonstrou que a remoção da camada endotelial de artérias isoladas previne a resposta relaxante in vitro à acetilcolina. O EDR de Robert Furchgott, foi identificado há 30 anos como NO. O NO é um potente vasodilatador, ele é um mediador endotelial que atua sobre o músculo liso fazendo com que ele relaxe. Além disso, ele tem papel fundamental na proteção exercida pelo endotélio contra constrições anormais, aterosclerose de grandes artérias coronárias, inibe a agregação de plaquetas, a expressão de moléculas de adesão no superfície das células endoteliais e, portanto, a adesão e penetração dos glóbulos brancos (macrófagos), e a liberação e ação do vasoconstritor e peptídeo mitogênico endotelina-1 (VANHOUTTE et al., 2017).

O NO é sintetizado a partir da conversão enzimática da L-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS), que tem três isoformas: NOS endotelial (eNOS, NOS3), NOS neuronal (nNOS, NOS1) e NOS induzível (iNOS, NOS2) (LOWRY et al., 2013; VANHOUTTE et al., 2017; FARAH, MICHAEL, BALLIGAND, 2018). As NOSs são enzimas homodiméricas oxidoredutase, compostas por um domínio oxigenase amino-terminal que contém sítios de ligação para o substrato L -arginina, o cofator tetrahidrobiopterina (BH₄), um cluster de heme férrico, Um domínio redutase com

sítios de ligação para os doadores de elétrons nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). Ambos os domínios estão ligados por uma sequência que se liga ao cálcio (Ca^{2+} calmodulina). Após a ativação da NOS, as flavinas no domínio redutase transferem elétrons derivados de NADPH para o heme no domínio oxigenase do outro monômero, permitindo a ligação do oxigênio (O_2) ao heme reduzido (Fe^{2+}) e a conversão de L-arginina em HO-L-arginina e em seguida em NO e L-citrulina. O recrutamento do complexo Ca^{2+} calmodulina é essencial para que ocorra essa transferência de elétrons (FARAH, MICHAEL, BALLIGAND, 2018).

A eNOS e a nNOS são expressas constitutivamente (LOWRY et al., 2013; FARAH, MICHAEL, BALLIGAND, 2018). Elas são ainda reguladas por mecanismos transcricionais, pós-transcricionais, como microRNA, e pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, interação proteína-proteína, S-nitrosilação e S-glutathionilação. Por outro lado, a isoforma induzível, iNOS, é regulada principalmente através da transcrição gênica sob condições pró-inflamatórias e de estresse oxidativo (FARAH, MICHAEL, BALLIGAND, 2018). Além disso, a nNOS e eNOS necessitam do aumento de Ca^{2+} intracelular para ativação, já a expressão de iNOS é induzida em resposta a estímulos inflamatórios e uma vez sintetizada, necessita de concentrações basais de Ca^{2+} , assim constitutivamente ativo (LOWRY et al., 2013; FARAH, MICHAEL, VANHOUTTE et al., 2017; BALLIGAND, 2018). Nos vasos sanguíneos a fonte primária de NO é a eNOS em condições normais, enquanto a iNOS se torna proeminente em condições inflamatórias (LOWRY et al., 2013).

Sob condições fisiológicas, o NO é liberado no lúmen do vaso inibe a agregação plaquetária e a trombose. Concomitantemente, o NO se difunde ao músculo liso e ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) para produzir cGMP e ativar a proteína quinase G (PKG) nas células musculares lisas. O cGMP e o PKG contribuem para diminuir os níveis intracelulares de Ca^{2+} estimulando sua recaptação pela ATPase de cálcio do retículo endoplasmático e sua extrusão através da ATPase transportadora de cálcio da membrana plasmática. Além disso, a PKG desencadeia o efluxo de K^+ pelo canal de potássio sensível a Ca^{2+} de grande condutância (BK Ca) para hiperpolarizar a célula, reduzindo assim a entrada de Ca^{2+} através do canal de cálcio tipo L (LTCC). Finalmente, a PKG promove a desfosforilação da cadeia leve da

miosina através da fosfatase associada (MLCP). Juntas, essas modificações mediam o vasorelaxamento (LOWRY et al., 2013).

1.3.2.2 O endotélio vascular e suas possíveis contribuições para a patogênese da COVID-19

Embora o endotélio seja extremamente importante para a homeostase do organismo, ele também pode contribuir para o agravamento de doenças quando se torna disfuncional e suas funções defensivas se voltam contra o hospedeiro (LIBBY, LUSCHER, 2020). A disfunção endotelial é a marca registrada de muitas doenças cardiovasculares e metabólicas (GIORDO et al., 2021). Curiosamente, estudos indicam que pacientes com fatores de risco cardiovascular e/ou doença cardiovascular prévia, têm maior risco de serem hospitalizados com COVID-19, apresentando pior prognóstico e maior taxa de mortalidade (HUERTAS et al., 2020; NAGELE et al., 2020; WU et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Esses fatores de risco incluem, idade avançada (> 65 anos), hipertensão, obesidade, diabetes mellitus, doença pulmonar crônica e doença arterial coronariana que têm como denominador comum a disfunção endotelial vascular (HUERTAS et al., 2020; NAGELE et al., 2020; GIORDO et al., 2021; QIAN et al., 2021). A associação da gravidade da COVID-19 com a lesão endotelial vascular parece plausível, uma vez que pacientes com a disfunção preexistente parecem ser mais vulneráveis ao curso grave da doença, tendo em vista que as CEVs formam uma barreira altamente eficaz entre a circulação e os tecidos periféricos e têm papel fundamental na homeostase e perfusão de órgãos (NAGELE et al., 2020; GIORDO et al., 2021). Tais evidências sugerem que o endotélio vascular apresenta um papel fisiopatológico chave no início e na progressão da doença (GIORDO et al., 2021).

Disfunções endoteliais foram relatadas em muitas infecções virais, como no caso da influenza A, de vírus hemorrágicos e de outros coronavírus, como o SARS-CoV e o MERS-CoV (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007; BONAVENTURA et al., 2021). É sabido que os vírus podem atuar de duas formas distintas, seja danificando diretamente os vasos sanguíneos, por meio de sua infecção ou através da resposta imune sistêmica (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007). Dados recentes obtidos em organóides de vasos sanguíneos humanos, desenvolvidos a partir de células-tronco pluripotentes, revelaram que o SARS-CoV-2 foi capaz de infectar diretamente as células vasculares, sendo detectada replicação viral ativa cerca de 3 a 6 dias após o contato (GIORDO et al., 2021). Outros estudos

evidenciaram ainda, elementos virais do SARS-CoV-2 em CEVs de pacientes com COVID-19, juntamente com um acúmulo de células inflamatórias e evidências de morte celular endotelial (HUERTAS et al., 2020; VARGA et al., 2020). Juntos, estas evidências sugerem que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar CEVs em amostras humanas e ainda gerar endotelite em vários órgãos (HUERTAS et al., 2020; VARGA et al., 2020; QIAN et al. 2021; LIU, et al., 2021).

Outro ponto importante, é que o recrutamento de células imunes em processos infecciosos, tanto por infecção viral direta nos vasos, quanto pela via imunomediada, uma vez que as CEVs são alvos chave de citocinas inflamatórias que resultam em disfunção endotelial disseminada associada à apoptose (LIBBY, LUSCHER, 2020; VARGA et al., 2020). Ao reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF liberadas na infecção pelo SARS-CoV-2, por exemplo), ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) - derivados de células mortas - as células endoteliais são ativadas para promover a recuperação do organismo (LIBBY, LUSCHER, 2020; BONAVENTURA et al., 2021; QIAN et al. 2021). Hipotetise-se que a hiper estimulação de CEVs pode desencadear, alterações no equilíbrio trombótico/fibrinolítico e de relaxamento/contração dos vasos sanguíneos, que podem resultar, no aumento da permeabilidade vascular, na perda das funções antitrombóticas e anti-inflamatórias, na secreção de citocinas e quimiocinas adicionais e no recrutamento de leucócitos (LIBBY, LUSCHER, 2020; VARGA et al., 2020; GIORDO et al., 2021). Tais alterações podem explicar, por exemplo, o quadro de coagulação intravascular disseminada (LIBBY, LUSCHER, 2020; NAGELE et al., 2020; BONAVENTURA et al., 2021; GIORDO et al., 2021; QIAN et al. 2021). Visto o exposto, a investigação da disfunção endotelial na COVID-19 torna-se de grande interesse, podendo os conhecimentos científicos proporcionarem não só um melhor entendimento da fisiopatologia da doença, como também, o manejo clínico adequado dos pacientes, a prospecção e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e o reposicionamento de drogas já conhecidas.

1.4 MODELO DE ESTUDOS

O desenvolvimento de contramedidas que reduzam a morbidade e a mortalidade da COVID-19 é uma prioridade para a comunidade global de pesquisa (WINKLER et al., 2020). Por se tratar de um sistema complexo que em grande parte

mimetiza o organismo humano a pesquisa com animais são essenciais para esse esforço (WINKLER et al., 2020). Vários modelos animais já foram descritos como suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, como, furões, hamsters e primatas não-humanos. No entanto, por possuírem replicação viral, histopatologia e doença clínica limitadas, não reproduzem a doença grave observada em humanos hospitalizados (DINNON et al., 2020; LUTZ et al., 2020; SINGH et al., 2020; WINKLER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Camundongos selvagens de laboratório, por sua vez, não se infectam com SARS-CoV-2, devido a não expressão da proteína ECA2 (DINNON et al., 2020; WINKLER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Em virtude disso, pesquisadores buscaram novas estratégias para adaptar esses roedores à infecção, através da modificação tanto do hospedeiro, quanto do vírus (ANDRADE et al., 2021).

Uma destas estratégias refere-se à infecção de camundongos modificados geneticamente que expressem o receptor ECA2 humano, como os camundongos transgênicos K18-hACE2 (WINKLER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Os K18-hACE2, foram originalmente desenvolvidos para o estudo da patogênese do SARS-CoV. A expressão de ECA2 nos animais é disparada pelo promotor da citoqueratina-18 (K18) das células epiteliais. Nestes camundongos, a infecção pelo SARS-CoV-2 provocou doença pulmonar grave e altos níveis de RNA viral detectados nos pulmões a partir do segundo dia após a infecção (WINKLER et al., 2020). Além disso, o RNA viral foi detectado em vários outros tecidos, como, coração, rim, baço, e trato gastrointestinal (duodeno, íleo e cólon) (WINKLER et al., 2020). Camundongos K18-hACE2 infectados por SARS-CoV-2 apresentam ainda, declínios de vários parâmetros da função pulmonar, infiltrados de monócitos, neutrófilos e células T ativadas, altos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e pneumonia intersticial e consolidada grave. Por conta disso, o uso deste modelo é interessante para se estudar os mecanismos da patogênese da COVID-19 grave (WINKLER et al., 2020).

Todavia, algumas limitações são observadas para este modelo, como, por não ser fisiológica, a expressão de ECA2 apresenta níveis diferentes da ECA2 endógena humana, sendo independente, inclusive, de sistemas regulatórios (WINKLER et al., 2020). Diferenças genéticas também são apresentadas, enquanto em humanos o gene ECA2 está localizado no cromossomo X, o transgene da ECA2 é inserido como

múltiplas cópias no cromossomo 2 do camundongo. Por conta disso, comorbidades que alteram a expressão de ECA2 em humanos (como obesidade, hipertensão e diabetes) não podem ser fielmente representadas neste camundongo (WINKLER et al., 2020). Ademais, o vírus SARS-CoV-2, demanda nível de biossegurança 3, que é escasso na maioria dos laboratórios de pesquisa (ANDRADE et al., 2021).

Outra boa estratégia de estudo da COVID-19, se baseia na possibilidade do uso de outros betacoronavírus, a fim de se reproduzir aspectos da infecção por coronavírus humano (DINNON et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Dentre estes, destacam-se os betacoronavírus murinos, como o Coronavírus da Hepatite Murina (MHV), patógeno natural de camundongos. Os coronavírus murinos apresentam tanto um tropismo primário para o trato respiratório, quanto para a mucosa entérica. Cepas respiratórias MHV-1, MHV-2, MHV-3, MHV-JHM (MHV-4), MHV-A59 e MHV-S se replicam inicialmente no epitélio nasal e olfatório, depois nos pulmões, de onde se disseminam sistemicamente, para locais como o fígado, medula óssea, cérebro, tecido linfóide e órgãos reprodutivos (YANG et al., 2014; DINNON et al., 2020; KORNER et al., 2020). Ao ser inoculado via intranasal, o MHV é capaz de induzir uma doença grave e letal em camundongos (YANG et al., 2014).

Um estudo publicado em 2014, utilizando camundongos C57BL/6J infectados via intranasal com inóculo de MHV-A59, mostrou que a infecção foi capaz de induzir tanto a replicação viral do betacoronavírus, quanto o quadro de pneumonia aguda e lesão pulmonar nos animais (YANG et al., 2014). Outro estudo publicado em 2021, mostrou que a infecção intranasal pela cepa 3 do vírus da hepatite murina (MHV-3) foi capaz de produzir doença respiratória transitória, com comprometimento funcional pulmonar e características patológicas similares à síndrome respiratória aguda grave, em camundongos do tipo selvagem. A replicação eficiente do vírus nos pulmões e dano tecidual associado à inflamação também foram observados (ANDRADE et al., 2021). Além disso, após manifestações respiratórias, o MHV-3 se espalhou para vários órgãos, causando manifestações extrapulmonares e morte. Assim, por reproduzir as características fisiopatológicas da doença humana o MHV-3 se mostrou um excelente modelo pré-clínico para estudar a patogênese, o tropismo, a virulência, a resposta imune aos coronavírus, bem como a doença sistêmica (ANDRADE et al., 2021). Ademais, o manuseio do MHV-3 requer apenas contenção de nível de biossegurança 2, em oposição ao nível de biossegurança 3, necessária para o SARS-

CoV-2, o que o torna uma plataforma de estudo significativamente menos onerosa (KORNER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021).

Semelhantemente a outros modelos animais já propostos para o estudo da COVID-19, o modelo MHV-3 também apresenta limitações. Uma delas refere-se à diferença no receptor da célula hospedeira utilizada para a entrada viral. Ocorre que todas as cepas de MHV usam como receptor a molécula de adesão celular a CEACAM-1, enquanto o SARS-CoV-2 usa a ECA2, o que pode impossibilitar estudos de entrada viral ou drogas que atuem nessa etapa do ciclo de replicação (ANDRADE et al., 2021). Por fim, embora sinais de lesão hepática tenham sido frequentemente relatados em pacientes com COVID-19, as alterações hepáticas induzidas pelo MHV parecem ser de maior magnitude do que as desencadeadas pelo SARS-CoV-2. Além disso, por conta da metabolização de fármacos se dar em maior parte no fígado, estudos farmacológicos também são prejudicados (ANDRADE et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Os coronavírus apresentam alta prevalência e ampla distribuição, tendo as coronaviroses e, mais especificamente a COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, se apresentado como um grande desafio para a saúde pública, não só por ainda não ter um tratamento específico eficaz, mas também por conta da variedade de sinais e sintomas clínicos apresentados e diferentes níveis de gravidade (ANDRADE et al., 2021; V'KOVSKI, et al., 2021). A presença de um genoma extraordinariamente extenso, uma RNA polimerase variável e uma alta taxa de mutação, contribuem também para a ampla variedade de coronavírus conhecidos, além de facilitar o surgimento de novas espécies patogênicas (ZAKI et al., 2012; SHE et al., 2020; ANDRADE et al., 2021; V'KOVSKI, et al., 2021).

Não obstante, evidências científicas têm apontado que o SARS-CoV-2 é capaz de afetar o sistema cardiovascular, levando a desfechos clínicos insatisfatórios. Uma série de complicações vasculares diferentes, como coagulopatia, ativação do complemento, liberação de citocinas, hiperatividade plaquetária, apoptose, e endoteliopatia são propostas como potenciais contribuintes para a patogênese da COVID-19 (NAGELE et al., 2020; BONAVENTURA et al., 2021; GIORDO et al., 2021; QIAN et al., 2021). Embora a comunidade científica tenha avançado em suas pesquisas, ainda são escassos os estudos que relacionam o papel do sistema vascular com a patogênese da COVID-19. Além disso, verifica-se uma lacuna relacionada ao conhecimento dos possíveis mecanismos celulares e moleculares subjacentes às disfunções vasculares que estão associados à infecção pelo SARS-CoV-2. Logo, entender os potenciais mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 induz a ativação e a disfunção vascular podem contribuir para a elucidação de possíveis rotas translacionais para a clínica, uma vez que isso depende intimamente da compreensão aprofundada dos mecanismos básicos. Finalmente, é de fundamental importância a investigação dos danos hemodinâmicos provocados pelas coronaviroses e sua relação com a letalidade da doença.

Um desafio para se estudar os mecanismos da fisiopatologia da infecção por SARS-CoV-2 é a disponibilidade de modelos experimentais que reproduzam as características da doença em humanos. Neste sentido, grupos de pesquisa já mostraram que tanto a infecção intranasal de camundongos com o betacoronavírus MHV-3, quanto a utilização de animais transgênicos que expressam a ECA2 humana,

são modelos adequados para estudo (WINKLER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Dessa forma, objetivamos com este trabalho, investigar as possíveis alterações vasculares promovidas pela infecção por betacoronavírus utilizando modelos animais, bem como avaliar os mecanismos subjacentes, as repercussões hemodinâmicas e a correlação com a letalidade

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto das infecções pelos betacoronavírus MHV-3 e SARS-CoV-2 na função vascular, utilizando camundongos C57BL/6 e transgênicos K18-hACE2 como modelo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da infecção sobre a mortalidade dos animais;
- Avaliar o efeito da infecção sobre a saturação de oxigênio;
- Detectar se o betacoronavirus é capaz de infectar vasos sanguíneos;
- Analisar a resposta vasoconstritora na artéria aorta, na artéria mesentérica de resistência na veia cava;
- Analisar a resposta vasodilatadora na artéria aorta;
- Identificar os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares causadas pelas betacoronaviroses;
- Avaliar as repercussões hemodinâmicas, pressão arterial e fluxo sanguíneo, ocasionadas pela infecção.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA - UFMG) (nº 190/2020, 191/2021, e 111/2022) e foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA – MCT) (BRASIL, 2016). Foram utilizados camundongos machos de 6 a 8 semanas de vida. Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os camundongos knockout para os genes da óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}), da subunidade gp91Phox da NADPH oxidase (gp91phox^{-/-}), do receptor 1 do TNF (TNFR1) e camundongos K18-hACE 2, que expressam a ECA2 humana, foram originalmente obtidos dos Laboratórios Jackson e procriados no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFMG. Os animais foram mantidos em micro isoladores individuais, com acesso ad libitum a água e alimento (ração labina) e sob condições controladas de temperatura (23 – 24 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas).

4.2 VÍRUS

As cepas de MHV-3 e SARS-CoV-2 (cepa P1) foram fornecidas pela Profa. Vivian Vasconcelos Costa do Departamento de Morfologia (ICB/UFMG). Os experimentos com o vírus SARS-CoV-2 foram realizados no Laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB3) do ICB/UFMG.

4.3 INFECÇÃO POR MHV-3 E SARS-COV-2

Após anestesia com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (50 mg /kg) e xilazina (5 mg/kg), os camundongos receberam, por via intranasal, 30 µl de solução de salina estéril (grupo não infectado, MOCK) ou 30 µl de inóculo MHV-3 (3 x 10², grupo MHV-3) ou SARS-CoV-2 (3 x 10⁴, grupo SARS-CoV-2) unidades formadoras de placas (PFU), diluídos em solução de salina estéril (ANDRADE et al., 2021).

4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INFECÇÃO POR INSTILAÇÃO NASAL POR MHV-3 SOBRE A MORTALIDADE E SOBRE A SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO

Para analisar a letalidade causada pela infecção com o MHV-3, foi realizada uma curva de mortalidade entre os grupos MOCK e MHV-3. A sobrevivência foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e comparada entre os grupos. Foi considerado óbito, a morte do animal ou perda de peso superior a 20% do peso inicial, conforme determina a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMG).

Para analisar a saturação de oxigênio sanguíneo por gasometria sanguínea (Wondfo BGA-102 Blood Gas Analyzer - SF10335601267). O sangue foi coletado por decapitação e em seguida o sangue foi armazenado em seringas heparinizadas com de lítio. A amostra e o Cartão de teste BGA foram inseridos e os resultados registrados. Os grupos MOCK e MHV-3 foram comparados entre si.

4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Após a eutanásia dos animais foi realizada em conformidade com as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016). Para os experimentos de titulação viral, aferição da pressão arterial, doppler e curva de mortalidade, quando necessário, os animais foram eutanasiados por decapitação, sob anestesia (injeção i.p. de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg)). Para os demais experimentos (reatividade vascular, imunofluorescência e microscopia de fluorescência) a eutanásia foi feita por decapitação sem uso de anestesia prévia, ou qualquer outro agente químico, uma vez que estes podem interferir diretamente nos resultados da pesquisa (MERIN, 1981). Foram coletados sangue/plasma, artéria aorta, artéria mesentérica, veia cava inferior, pulmão e fígado. Cada tecido foi processado conforme a metodologia descrita a seguir.

4.6 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DIRETA DOS VASOS PELO MHV-3 POR TITULAÇÃO VIRAL

A estirpe MHV-3 (nº de acesso GenBank MW620427.1; ANDRADE et al., 2021) foi propagada em células *Musculus musculus* L929 (ATCC® CCL-1TM). As células L929 foram cultivadas em atmosfera controlada (37°C e 5% CO₂) no meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com, 5% de solução de albumina de

soro bovino (BSA 1%), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para a titulação viral, 100 µl de amostra, artéria aorta, artéria mesentérica, pulmão e fígado, foram diluídas em meio DMEM na proporção de 1 parte de tecido para 9 partes de meio. Em seguida foram feitas diluições seriadas que foram inoculadas em uma monocamada confluyente de células L929 e cultivadas em placas de 24 poços. Após agitação suave por 1 h (4 × 15 min), as amostras foram retiradas e substituídas pelo meio de revestimento DMEM, suplementado com, 0,8% de carboximetilcelulose, 2% de solução de albumina BSA (1%) e 1% de penicilina-estreptomicina-glutamina. As células foram mantidas por 2 dias em atmosfera controlada e então, fixadas com 10% de formalina neutra tamponada durante 1 h e coradas com 0,1% de violeta cristal. O título viral foi determinado como PFU.

4.7 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR

4.7.1 Artéria aorta

Após a eutanásia do camundongo, a aorta torácica foi isolada, dissecada dos tecidos conjuntivo e adiposo perivascular, seccionada transversalmente em anéis de 2 - 3 mm de comprimento e montada em um sistema de banho de órgãos isolados. Os anéis aórticos foram mantidos a 37 °C sob tensão de 4,9 mN (0,5 g) até a estabilização (60 minutos) em solução de Krebs-Henseleit (110,8 mM NaCl; 5,9 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 1,07 mM MgSO₄; 2,49 mM CaCl₂; 2,33 mM NaH₂PO₄ e 11,51 mM glicose). A solução foi aerada continuamente com uma mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂), visando manter o pH em 7,4. As medidas de tensão isométrica foram captadas por um transdutor de força (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EUA), ampliadas por um amplificador-gravador (modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc.) e registradas por um sistema de aquisição de dados (DI-710, Dataq ® Instruments, Akron, OH, EUA) conectado a um computador. As mudanças na tensão isométrica foram analisadas usando o software WinDaq Data Acquisition (Dataq ® Instruments, Akron, OH, EUA).

A integridade do endotélio foi avaliada por meio da adição de acetilcolina (ACh; 10⁻⁶ mol/L) ao banho, em vasos pré-contraídos com fenilefrina (Fen; 3 x 10⁻⁷ mol/L). Foram considerados vasos contendo endotélio funcional, aqueles que apresentaram no mínimo 80% de relaxamento à ACh e desprovidos de um endotélio funcional, aqueles que apresentaram menos de 10% de relaxamento.

A contração vascular foi avaliada pela construção de curvas concentração-resposta cumulativas de Fen (10^{-9} a 10^{-4} mol/L) na presença ou ausência de endotélio funcional. As curvas concentração-resposta foram comparadas entre os grupos MHV-3 e MOCK. Para avaliação dos mecanismos envolvidos nas disfunções contráteis, os anéis aórticos de foram incubados por 30 minutos com N ω -nitro-L-arginina (L-NNA, 10^{-4} mol/L) um inibidor de todas as três isoformas de NOS, carboxi-PTIO (10^{-4} mol/L) um sequestrado de NO, ou 1400W (10^{-5} mol/L) um inibidor farmacológico específico para a isoforma iNOS. As curvas concentração-resposta foram comparadas entre o grupos MHV-3 com a adição de drogas em relação ao mesmo grupo sem a adição da mesma. Curvas concentração-resposta à Fen (10^{-9} a 10^{-4} mol/L) também foram construídas em anéis aórticos de camundongos iNOS $^{-/-}$ e TNF $^{-/-}$, infectados ou não, e comparadas entre si. Para avaliar a capacidade de contração do músculo liso vascular, uma curva concentração resposta ao KCl (10×10^{-3} mol/L a 100×10^{-3} mol/L) foi desenvolvida e os grupos MHV-3 e MOCK foram comparados.

O relaxamento vascular foi avaliado por curvas concentração-resposta acumulativa de ACh (10^{-9} a 10^{-4} mol/L), em anéis aórticos pré-contraídos com Fen (3×10^{-7} mol/L). Os resultados foram comparados entre os grupos MHV-3 e MOCK. Para avaliação dos mecanismos envolvidos na disfunção de relaxamento, os anéis aórticos de foram incubados por 30 minutos com Tiron (10^{-5} mol/L). As curvas concentração-resposta foram comparadas entre o grupos MHV-3 com a adição de Tiron em relação ao mesmo grupo sem a adição do mesmo. Curvas concentração-resposta acumulativas de ACh (10^{-9} a 10^{-4} mol/L) também foram construídas em anéis aórticos de camundongos gp91phox $^{-/-}$ e TNF $^{-/-}$, infectados ou não, e comparadas.

4.7.2 Artéria mesentérica de segunda ordem

Após a eutanásia do camundongo, o intestino delgado foi removido e fixado com pinos de aço inoxidável no fundo de uma placa de Petri coberta com elastômero de silicone sylgard. A artéria mesentérica de segunda ordem foi isolada, dissecada dos tecidos conjuntivo e adiposo perivascular e seccionada transversalmente em anéis de 1,6 - 2,0 mm de comprimento. Os anéis arteriais foram montados em câmaras de miógrafo de arame (Danish Myo Technology (DMT), Aarhus, Dinamarca) contendo solução salina fisiológica (PSS) (119 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,4 mM KH $_2$ PO $_4$; 14,9

mM NaHCO₃; 1,17 mM MgSO₄; 2,5 mM CaCl₂ e 5,5 mM glicose, pH 7,4) e mantidos sob tensão de 1,6 mN (0,16 g), até a estabilização (60 minutos). A solução foi aerada continuamente com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), visando manter o pH em 7,4.

A viabilidade arterial foi avaliada a partir da resposta contrátil a substituição do PSS regular pelo PSS-KCl (80 x 10⁻³ mol/L), composição similar à acima com ajuste equimolar de NaCl (39,7 x 10⁻³ mol/L) e KCl (80 x 10⁻³ mol/L). Os anéis vasculares não responsivos ao KCl-PSS foram descartados. A contração vascular foi avaliada pela construção de curvas de concentração-resposta cumulativas à Fen (10⁻⁸ a 10⁻⁴ mol/L) e os grupos MHV-3 e MOCK foram comparados.

4.7.3 Veia cava inferior

Após a eutanásia do camundongo, a veia cava inferior foi isolada, dissecada dos tecidos conjuntivo e adiposo perivascular e seccionada transversalmente em anéis de 2,0 mm. Os anéis venosos foram montados em câmaras de miógrafo de arame (Danish Myo Technology (DMT), Aarhus, Dinamarca) e mantidos sob tensão de 2,0 mN (0,2 g) até a estabilização (60 minutos) em solução de Krebs- Henseleit (110,8 mM NaCl; 5,9 mM KCl; 25 mM NaHCO₃; 1,07 mM MgSO₄; 2,49 mM CaCl₂; 2,33 mM NaH₂PO₄ e 11,51 mM glicose, pH 7,4). A solução foi aerada continuamente com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), visando manter o pH em 7,4.

A viabilidade da veia foi avaliada a partir da resposta contrátil a substituição da solução regular de Krebs por uma solução de KCl-Krebs (80 x 10⁻³ mol/L), com ajuste equimolar de NaCl (39,7 x 10⁻³ mol/L) e KCl (80 x 10⁻³ mol/L). Os anéis de veias que não responderam à solução de KCl foram descartados.

A contração vascular foi avaliada pela construção de curvas de concentração-resposta cumulativas à Fen (10⁻⁹ a 10⁻⁴ mol/L) e os grupos MHV-3 e MOCK foram comparados. Para avaliação dos mecanismos envolvidos na disfunção de contração, curvas concentração-resposta acumulativas de ACh (10⁻⁹ a 10⁻⁴ mol/L) também foram construídas em anéis aórticos de camundongos TNF^{-/-}, infectados ou não, e comparadas.

4.8 AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NAS DISFUNÇÕES VASCULARES CAUSADAS PELA INFECÇÃO POR MHV-3 E SARS-COV-2

Para melhor avaliar as vias de sinalização intracelulares envolvidas nas disfunções vasculares promovidas pela infecção pelos betacoronavírus, foram realizados experimentos para avaliação da produção de ROS e de NO por sondas fluorescentes e a expressão de iNOS e do NF- κ B por imunofluorescência, na aorta de camundongos controles e infectados com MHV-3 e SARS-CoV-2. Também foi feita a dosagem de TNF por ELISA na aorta e no plasma de camundongos MOCK e MHV-3. Os grupos infectados e não infectados foram comparados.

Para os experimentos de imunofluorescência e microscopia de fluorescência, a aorta foi isolada e dissecada do tecido conjuntivo e tecido adiposo perivascular, cortada em pedaços e incluída no meio de congelamento Tissue-Tek® O.C.T.TM (Sakura®, EUA). Foram feitos cortes transversais de 10 μ m por meio de um criostato (Leica 1850, Leica, EUA).

4.8.1 Avaliação *in situ* da produção de óxido nítrico e de espécies de oxigênio na aorta por sondas fluorescentes

As seções transversais da aorta foram incubadas por 30 minutos a 37°C, com 200 μ l/lâmina de dihidroetídio (DHE - 10 μ M) para avaliar a produção de ROS e de 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-2 - 8 μ M), para avaliar a produção de NO. As lâminas foram então fixadas por 5 minutos com paraformaldeído (PFA) a 4% e seladas com fluoromount (meio de montagem). As imagens foram capturadas com um microscópio de fluorescência Zeiss-APOTOME, usando filtros de 488 nm para o DAF e 555 nm para o DHE. O software Fiji (versão 1.51j8) foi utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, que foi normalizada para a área selecionada.

4.8.2 Avaliação *in situ* da expressão de iNOS e NF- κ B na aorta por imunofluorescência

As seções transversais foram fixadas com solução de PFA 4% por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas 3 vezes BSA (1%). Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com BSA (3%, diluído em PBS 1x e 0,3% solução de Triton-X), por 30 minutos. As lâminas foram, então, novamente lavadas com BSA (1%) e incubadas *overnight* em uma câmara úmida, a 4 °C, com os seguintes

anticorpos primários diluídos em BSA (3%): anti-iNOS (1:200, Santa Cruz, sc-650) ou anti-NF- κ B (1:100, Santa Cruz, sc-372). As lâminas controle negativo, receberam o mesmo volume de BSA (3%). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com BSA (1%) e o anticorpo secundário (anti-coelho feito em cabra, 1:300 Alexa Fluor 555, Thermo-Fisher ou anti-ovelha feito em burro, 1:300 Alexa Fluor 555, Abcam) foi adicionado por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com BSA (1%) e incubadas com o corante nuclear seletivo fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloreto; 1:250), por 5 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com BSA (1%) e, em seguida, seladas com fluoromount (meio de montagem). As imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência Zeiss-APOTOME, usando filtros de 555 nm para o anticorpo secundário, 355 nm para o DAPI e 488 nm para a autofluorescência das fibras de elastina. O software Fiji (versão 1.51j8) foi utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, que foi normalizada para a área selecionada.

4.8.3 ELISA

Foi feita a quantificação da concentração de TNF (cat. nº DY 410) na aorta e plasma por meio de kits comerciais (Sistemas de B&D). Em resumo, a aorta foi homogeneizada em tampão de extração de citocinas, centrifugada e o sobrenadante foi coletado para dosagem. O sangue foi centrifugado e o plasma foi coletado para dosagem. Foi feita a leitura em um leitor de microplacas equipado com uma luz de excitação de 492 nm. A concentração de citocinas foi determinada a partir de uma curva de concentrações conhecidas.

4.9 AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA INFECÇÃO POR MHV-3 SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL

A PAS foi medida de forma não invasiva por pletismografia de cauda em camundongos conscientes usando o sistema MBRP (IITC Life Science Inc.). Os camundongos foram aclimatados por sete dias para minimizar possíveis interferências. O camundongo consciente foi posicionado na câmara aquecida, com temperatura controlada à 32°C, por dez minutos. Na cauda do animal foi posicionado um sensor incorporado a um manguito, utilizados para a medida da pressão. A medida foi registrada por meio de um sistema de aquisição de dados. Os valores da

PAS foram medidos diariamente após a infecção e comparados ao valor medido antes da infecção (0 DPI).

4.10 AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA INFECÇÃO POR MHV-3 SOBRE PERFUSÃO SANGUÍNEA

As medidas do fluxo sanguíneo foram obtidas por imagem de perfusão geradas a partir do laser doppler (LDPI, Moor Instruments, Devon, Reino Unido). A medida foi realizada com os camundongos anestesiados (cetamina 50 mg/kg e xilazina 5 mg/kg), um dia antes da infecção (0 DPI) e nos 3, 4 e 5 DPI. Os camundongos foram colados em decúbito dorsal sobre uma manta de aquecimento a 37°C e as patas traseiras foram posicionadas para cima. Uma quantidade mínima de luz ambiente foi usada durante o experimento para evitar interferência da luz externa. O valor médio dos pixels da imagem digitalizada foi calculado usando o software MoorLDI V5.3. O fluxo médio foi expresso como unidades de perfusão em unidades arbitrárias (a.u.), que representa a quantidade de sangue que flui através da região avaliada. Tanto as pernas quanto a base da cauda foram escolhidas para avaliação. Os valores foram comparados ao valor medido antes da infecção (0 DPI).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0. Foram usados testes Shapiro-Wilk para determinar a normalidade dos dados. O teste t de Student foi usado para comparar dois grupos. As curvas de concentração-resposta foram comparadas usando ANOVA bidirecional. A análise de sobrevivência de Kaplan-Meier foi usada para determinar as taxas de sobrevivência entre os grupos. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM.) e os grupos com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes, onde, valores $\leq 0,05$ foi identificado com *, valor $\leq 0,005$ com **, valores $\leq 0,0005$ com *** e valores $< 0,0001$ com ****.

5 RESULTADOS

5.1 A INFECÇÃO INTRANASAL DE CAMUNDONGOS PELO MHV-3 RESULTA EM LETALIDADE DE 100% ATÉ O 6DPI, MESMO COM A SATURAÇÃO DE OXIGÊNIO PRESERVADA

Os animais infectados via instilação nasal com MHV-3 tiveram mortalidade de 100% até o 6DPI, o que corrobora com o estudo de ANDRADE et al., 2021 (**FIGURA 4A**). Os níveis de saturação de oxigênio (SO_2), também foram avaliados, não sendo diferentes entre os grupos MOCK ($96,25 \pm 0,25$ %; $n = 4$) e MHV-3 ($96,80 \pm 1,02$ %; $n = 5$; $p = 0,6545$; **FIGURA 4B**). Estes achados estão de acordo com estudos prévios, que traz a informação de que a inflamação pulmonar nestes animais, resolve-se até o 5º DPI (ANDRADE et al., 2021).

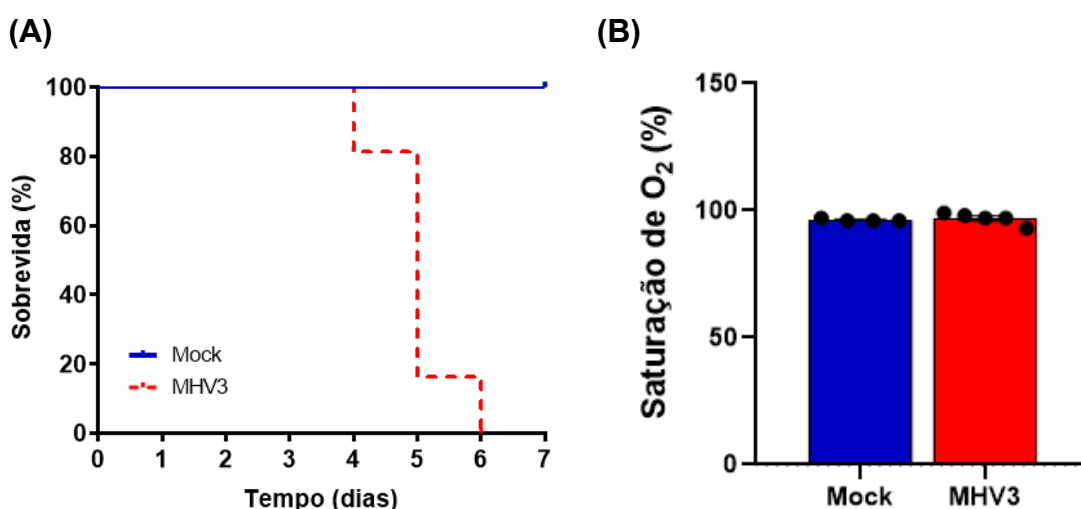


FIGURA 4 - A infecção intranasal de camundongos com MHV-3 causa letalidade de 100% até o 6 DPI, mesmo com a saturação de oxigênio preservada. (A) Representação gráfica das taxas de sobrevivência dos grupos MOCK e MHV-3. (B) Representação gráfica do índice de saturação de O_2 dos grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM..

5.2 O MHV-3 INFECTA A ARTÉRIA AORTA E ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS

A infecção intranasal de camundongos com MHV-3 afeta inicialmente os pulmões. Quando a doença se torna sistêmica, ela atinge e infecta outros órgãos, como, fígado, baço, coração, rim, cérebro e testículos (ANDRADE et al., 2021). Para investigar se o sistema vascular é um sítio de infecção, o título viral foi avaliado nas artérias aorta e mesentérica, no 5 DPI. A carga viral na aorta ($6,0 \pm 0,41$ Log PFU/g;

n = 4) e na mesentérica ($5,98 \pm 0,1$ Log PFU/g; n = 2), foram mensuradas e comparadas a amostras conhecidamente positivas para a infecção, o pulmão ($6,12 \pm 0,09$ Log PFU/g; n = 5) e o fígado ($6,35 \pm 0,08$ Log PFU/g; n = 5) (ANDRADE et al.,2021). O resultado mostrou que o vírus MHV-3 foi capaz de infectar os respectivos vasos sanguíneos (**GRÁFICO 1**).

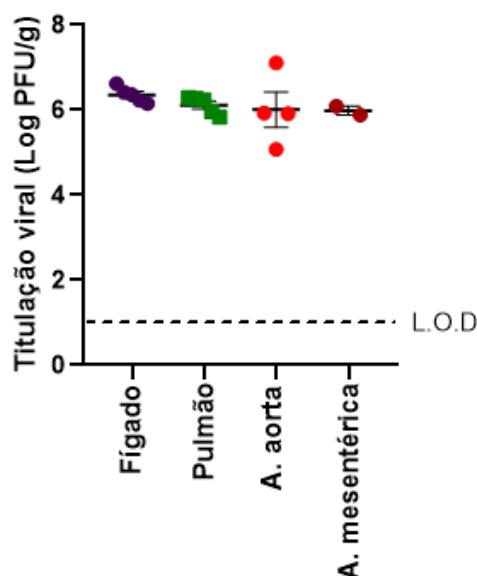


GRÁFICO 1 - O MHV-3 infecta a aorta e artérias mesentéricas de camundongos. Representação gráfica da titulação viral do MHV-3 detectado no fígado, pulmão, aorta torácica e artéria mesentérica de animais infectados (5DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM.

5.3 A INFECÇÃO POR MHV-3 DESENCADEIA DISFUNÇÃO VASCULAR CONTRÁTIL DEPENDENTE DE ENDOTÉLIO NA AORTA DE CAMUNDONGOS

A análise da resposta vascular contrátil da aorta mostrou que, no 3 DPI (n = 5) os grupos MOCK e MHV-3, quando comparados, não apresentaram resposta significativamente diferente quando estimulados com o agonista $\alpha 1$ adrenérgico fenilefrina. No entanto, no 4 DPI (n = 5) e 5 DPI (n = 7), foi observado que no grupo MHV-3, os níveis de contração foram drasticamente reduzidos quando comparados ao MOCK (n = 6; **FIGURA 5A**). Uma vez que a resposta de redução de contração foi igual no 4 e 5 DPI, os experimentos a seguir foram realizados somente no 5 DPI.

No 5 DPI, a remoção do endotélio vascular, normalizou a resposta contrátil dos vasos do grupo infectado aos níveis do grupo MOCK (**FIGURA 5B**). Isto porque, os grupos sem endotélio, $\text{MOCK}^{\text{E-}}$ (n = 5) e $\text{MHV-3}^{\text{E-}}$ (n = 5) apresentaram valores de contração equivalentes. Para confirmar se a disfunção contrátil era de origem

endotelial e não em decorrência a uma disfunção do músculo liso, no 5DPI, foi realizada a medida da resposta contrátil a concentrações cumulativas de KCl. Conforme mostrado, não foram observadas diferenças nas curvas concentração-resposta ao KCl entre os grupos MOCK (n = 4) e MHV-3 (n = 4; **FIGURA 5C**). Os resultados obtidos com o KCl corroboram com os resultados observados na aorta desprovida de endotélio funcional e reforçam a ideia de que a contratilidade vascular muscular é preservada na infecção causada pelo MHV-3. Portanto, em conjunto, os dados acima mostram que o animal infectado apresenta um declínio da responsividade à Fen na aorta que é dependente do endotélio.

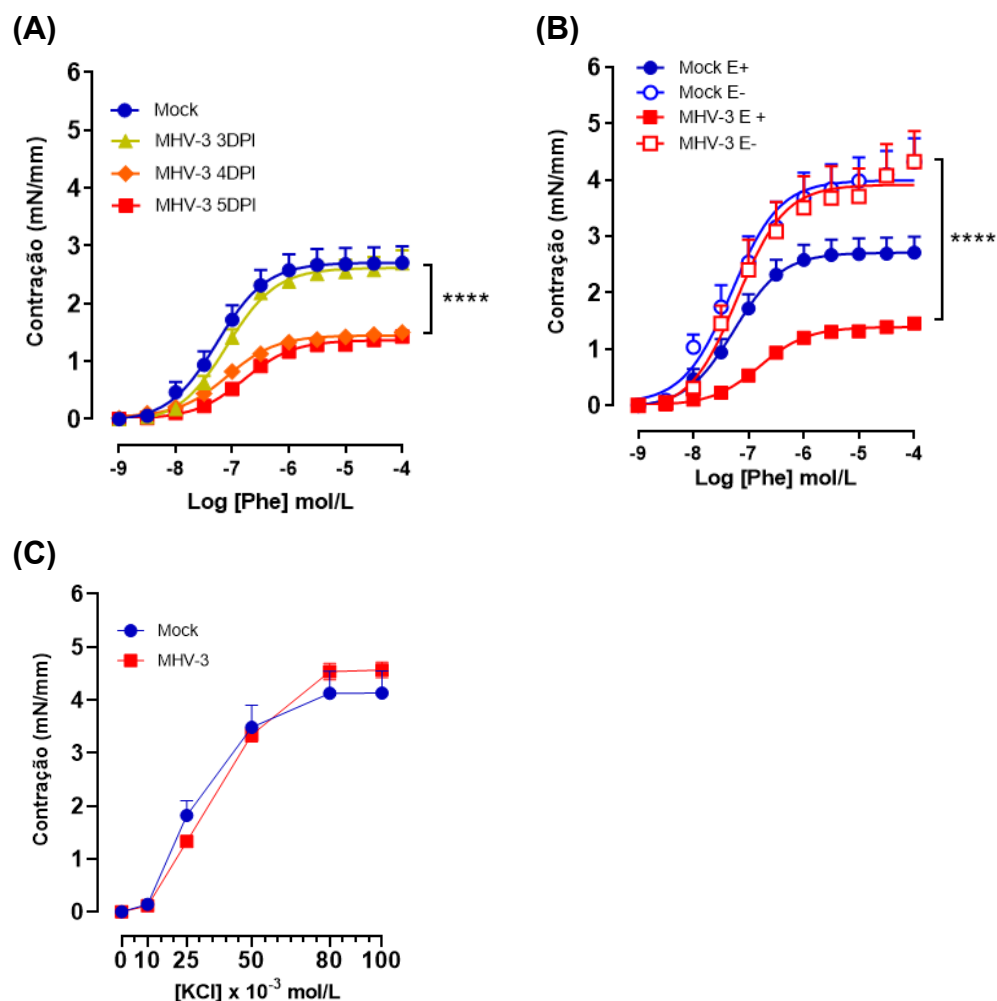


FIGURA 5 - A infecção por MHV-3 desencadeia disfunção vascular contrátil dependente de endotélio na aorta de camundongos. (A) Curva concentração-resposta cumulativa a Fen da aorta de camundongos dos grupos MOCK e MHV-3 em 3, 4 e 5 DPI. (B) Curva concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta dos grupos MOCK e MHV-3 (5DPI) na presença (E+) e na ausência (E-) de endotélio funcional. (C) Curva concentração-resposta cumulativa ao KCL na aorta dos grupos, MOCK e MHV-3. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM.. **** $p < 0,0001$.

5.4 A PRODUÇÃO DE NO VIA iNOS É A RESPONSÁVEL PELA DIMINUIÇÃO DA CONTRATILIDADE AÓRTICA DOS CAMUNDONGOS INFECTADOS COM O MHV-3

A fim de se elucidar os possíveis mecanismos associados à diminuição da contração, o NO, o principal EDRF na aorta, foi investigado (VANHOUTTE et al., 2015). Para isso, foi realizada sua dosagem (via sonda fluorescente DAF) em ambos os modelos de infecção, MHV-3 e SARS-CoV-2 (**FIGURA 6A, 6B**). Os dados mostraram que no 5 DPI, a intensidade de fluorescência estava aumentada no grupo infectado de ambos os modelos MHV-3 ($27,20 \pm 5,51$ a.u.; $n = 3$; $p = 0,0483$) e SARS-CoV-2 ($53,83 \pm 3,14$ a.u.; $n = 5$; $p = 0,0034$), quando comparados aos seus respectivos controles, MOCK MHV-3 ($13,82 \pm 2,25$ a.u.; $n = 6$) e MOCK SARS-CoV-2 ($25,67 \pm 5,94$ a.u.; $n = 3$; **FIGURA 6C, 6D**).

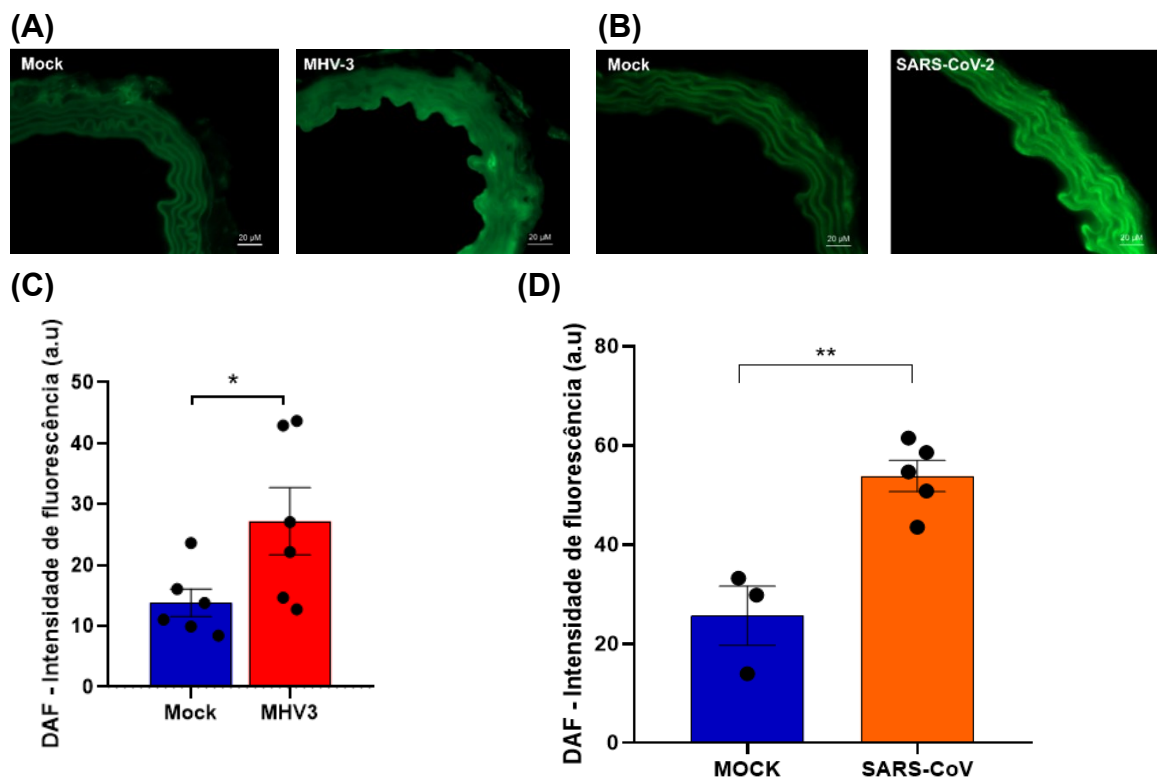


FIGURA 6 - Aumento da produção de óxido nítrico na aorta de camundongos infectados com betacoronavírus. (A) Figura representativa, fluorescência da sonda DAF na aorta dos grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). (B) Figura representativa da fluorescência da sonda DAF na aorta dos grupos MOCK e SARS-CoV-2 (5 DPI). (C) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF, nos grupos MOCK e MHV-3. (D) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF, nos grupos MOCK e SARS-CoV-2. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

Para verificar se o aumento de NO é responsável pela disfunção contrátil na aorta dos animais infectados, foram realizadas, no 5 DPI, curvas de concentração-resposta em duas situações diferentes:

1. Com inibição da síntese de NO a partir da inibição inespecífica das três isoformas de NOS (iNOS, e-NOS e nNOS) por meio da adição de L-NNA (10^{-4} mol/L) ao sistema de banho de órgãos (MHV-3; $n = 7$; **FIGURA 7A**);

2. Com a remoção do óxido nítrico formado pelos vasos com a adição de carboxi-PTIO (10^{-4} mol/L), um sequestrador de NO, ao sistema de banho de órgãos **FIGURA 7B**).

Em ambas as situações, tanto o L-NNA, quanto o carboxi-PTIO, foram capazes de normalizar os níveis de contração nos grupos infectados quando comparado aos grupos MOCK. Ou seja, tanto a inibição da produção de NO presente quanto o sequestro de NO, foram capazes de regularizar a contração na aorta dos animais infectados.

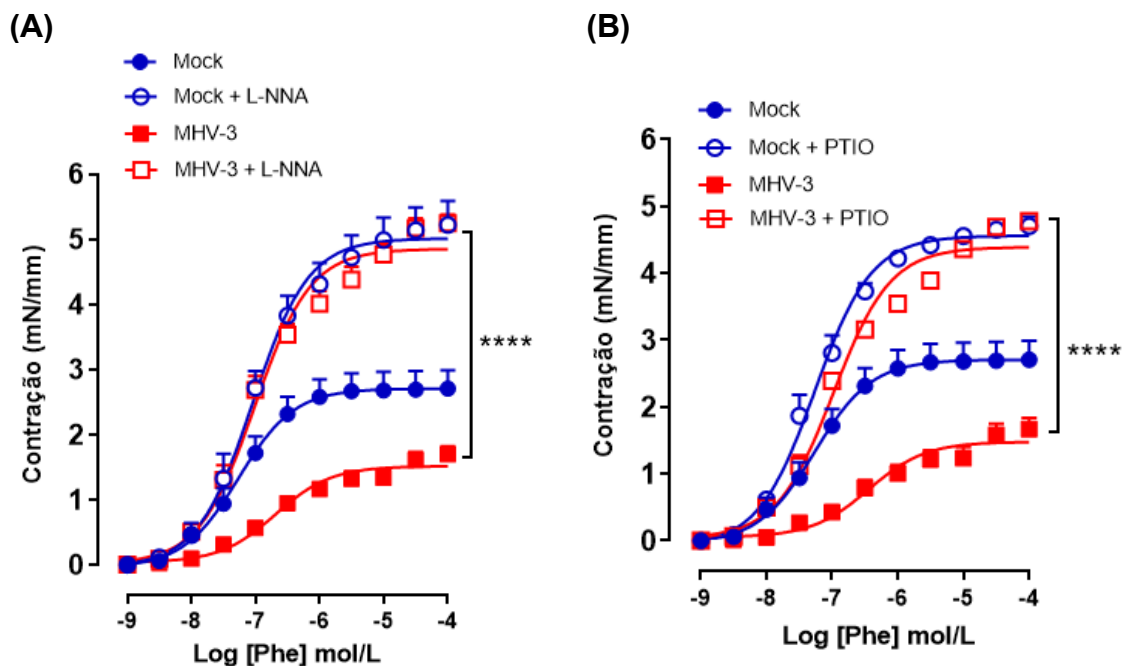


FIGURA 7 - O NO é responsável pela disfunção contrátil na aorta de camundongos infectados com MHV-3. (A) Curva de concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta de animais MOCK e MHV-3 na presença de L-NNA(+L-NNA) (5 DPI) ($n = 5 - 7$). (B) Curva de concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta de animais MOCK e MHV-3 com adição de carboxi-PTIO (+PTIO) (5 DPI) ($n = 5 - 7$). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. **** $p < 0,0001$.

Com o intuito de identificar qual isoforma das NOS estava envolvida no aumento da produção de NO nos animais infectados avaliamos a expressão da iNOS, principal isoforma das NOS ativada sob a ação de citocinas, interleucinas e outros mediadores inflamatórios (CHATKIN et al., 2000). Os nossos dados de imunofluorescência, mostraram que o grupo MHV-3 ($1,47 \pm 0,18$ a.u.; $n = 6$) apresentou fluorescência aumentada quando comparado ao grupo MOCK ($0,82 \pm 0,07$ a.u.; $n = 6$; $p = 0,0087$; FIGURA 8A, 8B). Da mesma forma, a aorta dos camundongos K18-hACE2 (FIGURA 9 A) infectados com o SARS-CoV-2 ($6,155 \pm 0,417$ a.u.; $n = 8$), apresentou fluorescência aumentada quando comparado ao controle MOCK ($4,681 \pm 0,0,184$ a.u.; $n = 6$; $p = 0,140$ – FIGURA 9B).

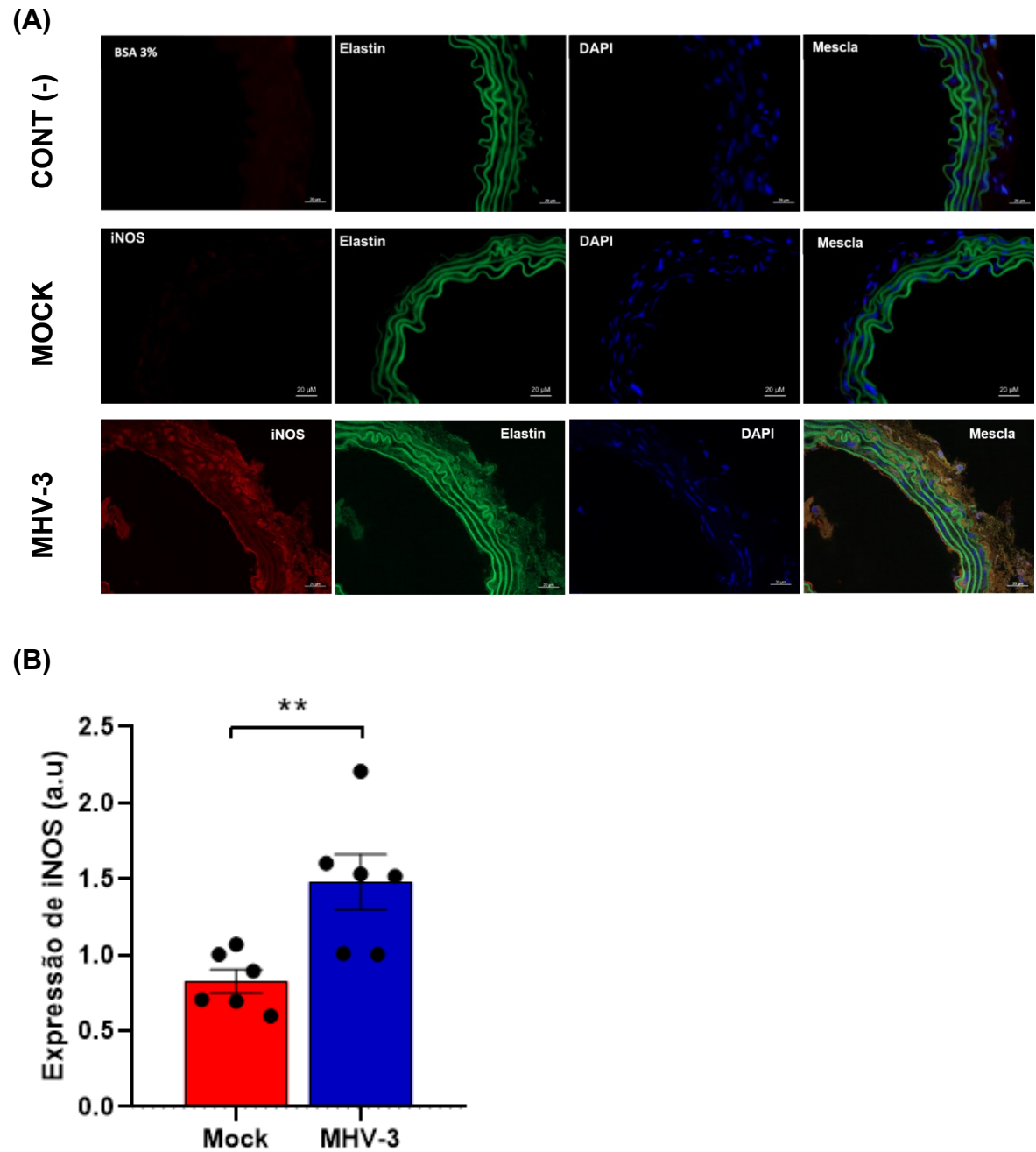


FIGURA 8 - A expressão vascular da iNOS está aumentada dos animais infectados com MHV-3.

(A) Figura representativa da imunofluorescência para iNOS na aorta dos grupos MOCK, MHV-3 e controle negativo (5DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida, que reflete a expressão de iNOS na aorta (N = 6). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. **p<0,01.

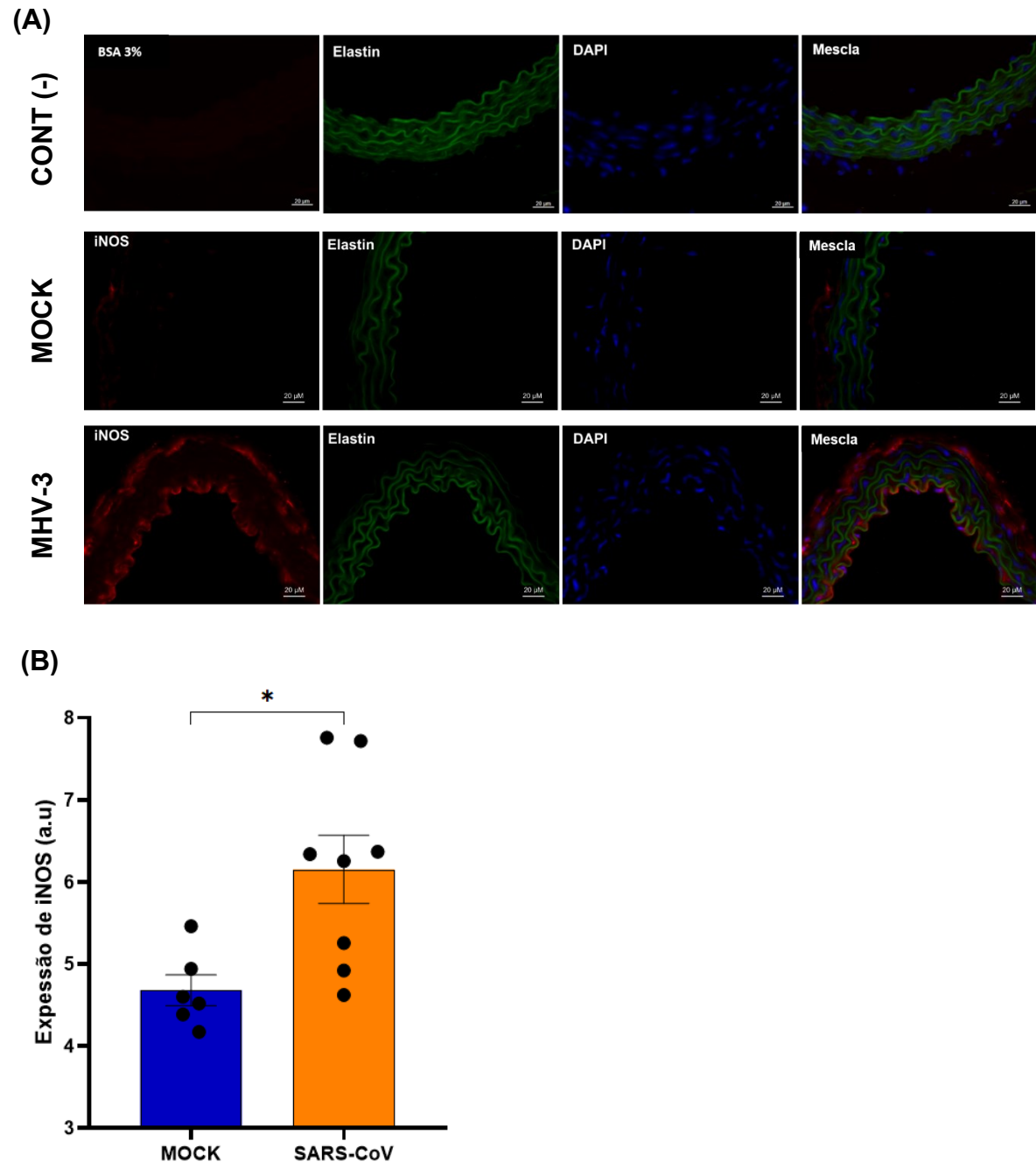


FIGURA 9 - A expressão vascular da iNOS está aumentada dos animais infectados com iNOS.

(A) Figura representativa da imunofluorescência para iNOS na aorta dos grupos MOCK, SARS-CoV-2 e controle negativo (5DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida, que reflete a expressão de iNOS na aorta. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. $**p < 0,01$.

A participação da iNOS na disfunção vascular foi investigada. Para isso foram realizadas no 5 DPI duas curvas de concentração-resposta em duas situações diferentes:

1. Com a inibição farmacológica seletiva da isoforma iNOS pela adição de 1400W (10^{-5} mol/L) ao sistema de banho de órgãos (**FIGURA 10A**);

2. Por meio da infecção de animais knockout para a iNOS ($iNOS^{-/-}$) ($iNOS^{-/-}$ MHV-3; $n = 4$) que foram comparados com os $iNOS^{-/-}$ não infectados ($iNOS^{-/-}$ MOCK; $n = 3$) (**FIGURA 10B**).

Os nossos resultados mostraram que a inibição da iNOS, com o 1400W foi capaz de normalizar a vasoconstrição no grupo infectado aos níveis do animal controle MOCK. De forma semelhante, os animais $iNOS^{-/-}$, infectados e controles, apresentaram níveis de contração semelhantes, sugerindo que o aumento na expressão de iNOS é necessária para a diminuição de contração ocorra na infecção pelo MHV-3. Em conjunto, os nossos dados mostram que tanto o bloqueio farmacológico, como a deleção gênica da iNOS, foram capazes de normalizar o nível de contração no animal infectado.

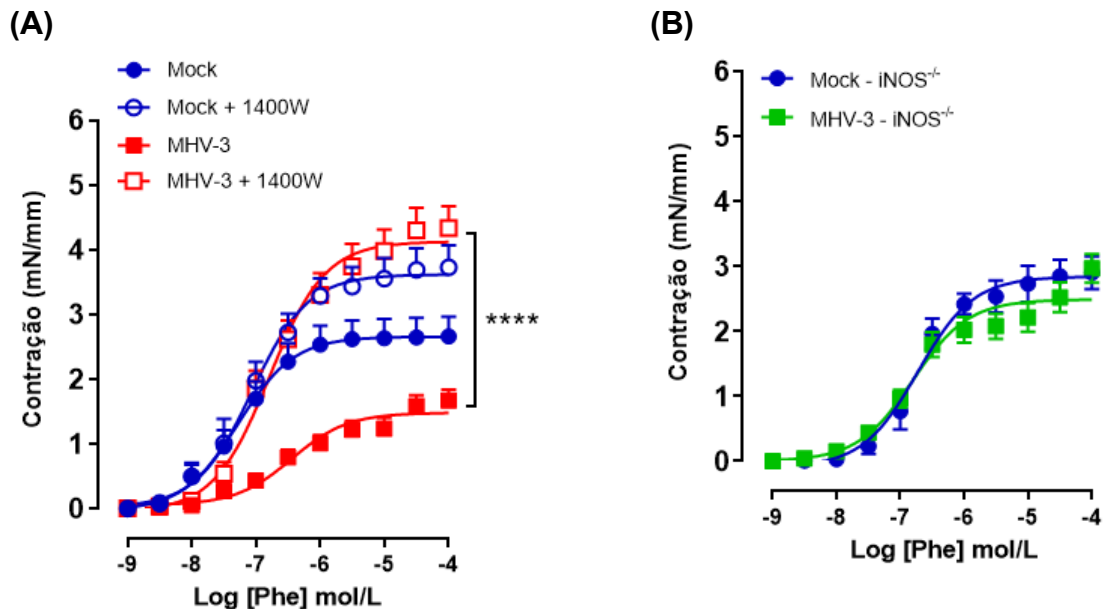


FIGURA 10 - A iNOS é responsável pela disfunção contrátil na aorta de camundongos infectados com MHV-3. (A) Curva de concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta de animais MOCK e MHV-3 com a adição de 1400 (MHV-3 + 1400W (5DPI) ($n = 5 - 7$)). (B) Curva de concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta de animais $iNOS^{-/-}$, grupos MOCK e MHV-3 (5DPI) ($n = 5 - 7$). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. **** $p < 0,0001$.

Em conjunto, os resultados até então apresentados, apontam que a diminuição da contratilidade da aorta induzida pela infecção pulmonar com MHV-3 ocorre em decorrência do um aumento na produção de NO sintetizado pela iNOS. É possível observar ainda, que a infecção pulmonar com SARS-CoV-2 também induziu um aumento na produção de NO e expressão de iNOS basal na aorta.

5.5 A INFECÇÃO POR MHV-3 AUMENTA A PRODUÇÃO DE ROS VIA NADPH OXIDASE QUE INDUZ DISFUNÇÃO DE RELAXAMENTO DA AORTA

O aumento da expressão da iNOS comumente está associada à indução do estresse oxidativo, que muitas vezes pode levar a disfunções no relaxamento vascular (ZHANG et al., 2009). Por este motivo, a produção de ROS, foi mensurada. A dosagem de ROS, utilizando a sonda DHE, mostrou que o grupo MHV-3 ($25,26 \pm 4,18$ a.u.; $n = 3$) apresentou fluorescência aumentada quando comparado ao MOCK ($12,83 \pm 0,71$ a.u.; $n = 6$; $p = 0,0190$; **FIGURA 11A e 11B**).

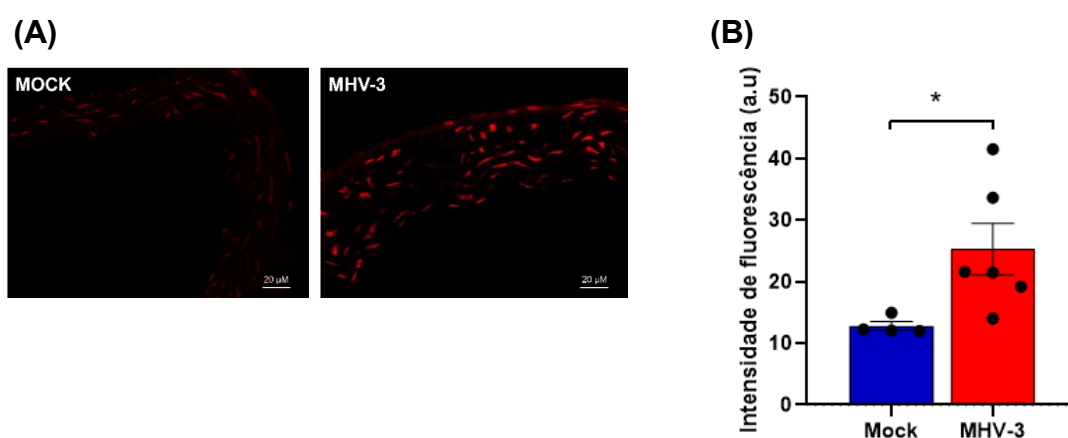


FIGURA 11 - A infecção com MHV-3 aumenta a produção de ROS na aorta. (A) Figura representativa da fluorescência da sonda DHE na aorta dos grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE, que reflete a quantidade de ROS presente na aorta. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$.

A medida da resposta vascular dilatadora na aorta mostrou que no 5 DPI o efeito vasodilatador em resposta à ACh foi reduzido na aorta do grupo MHV-3 ($n = 5$) quando comparado ao MOCK ($n = 6$) (**FIGURA 12A**). E com o propósito de se avaliar a contribuição do aumento de ROS para a disfunção, foram realizadas curvas de concentração-resposta à ACh em duas situações diferentes:

1. A partir do sequestro de ânions superóxido por meio da adição de Tiron (10^{-5} mol/L) (**FIGURA 12B**);
2. Por meio da infecção ou não com MHV-3 de animais geneticamente modificados com deleção genética do gene responsável pela expressão da subunidade gp91phox da NADPH oxidase (gp91phox^{-/-}; MOCK gp1phox^{-/-}, $n = 5$; MHV-3 gp91phox^{-/-}; $n = 5$ -**FIGURA 12C**).

A adição do sequestrador de ânions superóxido foi capaz de normalizar a vasodilatação no grupo infectado (MHV-3 + Tiron) aos níveis dos grupos MOCKs. Animais $gp91phox^{-/-}$, infectados e controles, apresentaram níveis de relaxamento semelhantes, quando comparados. No entanto, os animais apresentaram mortalidade semelhante aos animais selvagens (**FIGURA 12D**). Em suma, tanto a remoção de ânions superóxido, quanto a ausência da expressão da subunidade $gp91phox$ da NADPH oxidase foram capazes de normalizar o nível de relaxamento no animal infectado, porém, não foi capaz de evitar a morte do animal.

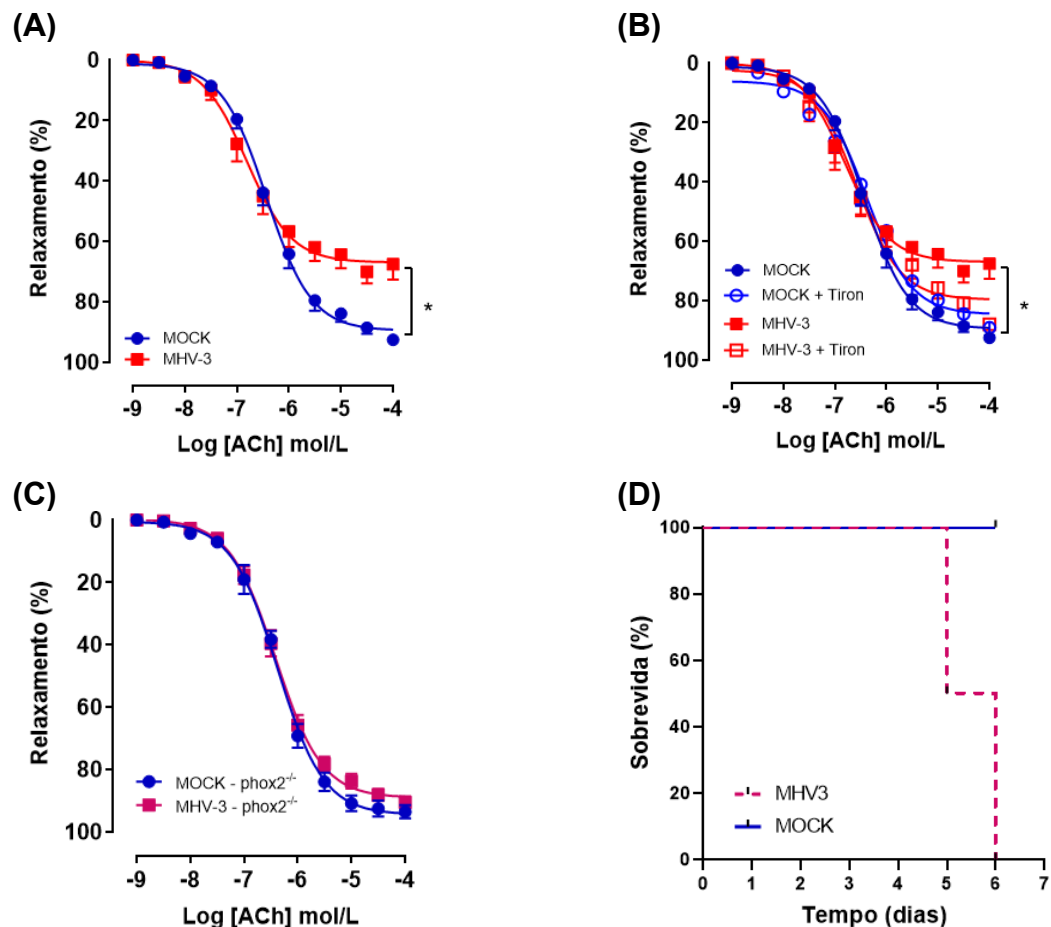


FIGURA 12 - A infecção com MHV-3 causa aumento na produção de ROS via NADPH oxidase e consequente causa disfunção no relaxamento vascular da artéria aorta. (A) Curva concentração-resposta cumulativa a ACh na aorta dos grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). (B) Curva concentração-resposta cumulativa à ACh na aorta dos grupos MOCK e MHV-3, na ausência ou na presença de Tiron (5DPI). (C) Curva concentração-resposta cumulativa à ACh na aorta de animais $gp91phox^{-/-}$, grupos MOCK e MHV-3 (5DPI). (D) Representação gráfica das taxas de sobrevivência dos animais $gp91phox^{-/-}$, grupos MOCK e MHV-3. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$.

Somados, os dados acima evidenciam que a infecção pelo MHV-3 é capaz de induzir, estresse oxidativo, por meio do aumento de ROS via NADPH oxidase. Este

estresse oxidativo, por sua vez, está associado ao comprometimento do relaxamento vascular da artéria aorta.

5.6 EFEITO DA INFECÇÃO COM MHV-3 NA CONTRATILIDADE DA VEIA CAVA, ARTÉRIA MESENERICA E PARAMETROS HEMODINÂMICOS

Em pacientes com COVID-19 admitidos na unidade de terapia intensiva com infecções agudas, a taxa de mortalidade hospitalar aumenta progressivamente à medida que a pressão sanguínea diminui (MAHESHWARI et al., 2018). Em virtude disso, avaliamos o impacto das alterações vasculares induzidas pela infecção viral sobre a PAS (n = 9 - 15). A pletismografia de cauda evidenciou que houve diminuição progressiva da PAS a partir do 4 DPI até a morte dos animais (4 DPI p = 0,0040; 5 DPI p<0,0001; **FIGURA 13A**). Dada a importância das artérias de resistência no controle da pressão arterial, a repercussão da infecção por MHV-3 sobre a contratilidade na artéria mesentérica foi avaliada (FINK, 2008). Não foram observadas alterações na contratilidade das artérias mesentéricas no 3 DPI (n = 3) e 4 DPI (n = 5), no entanto, de forma surpreendente, considerando a diminuição da pressão arterial, a resposta contrátil dobrou no 5 DPI (n = 4; **FIGURA 13B**) no grupo MHV-3 quando comparado ao MOCK.

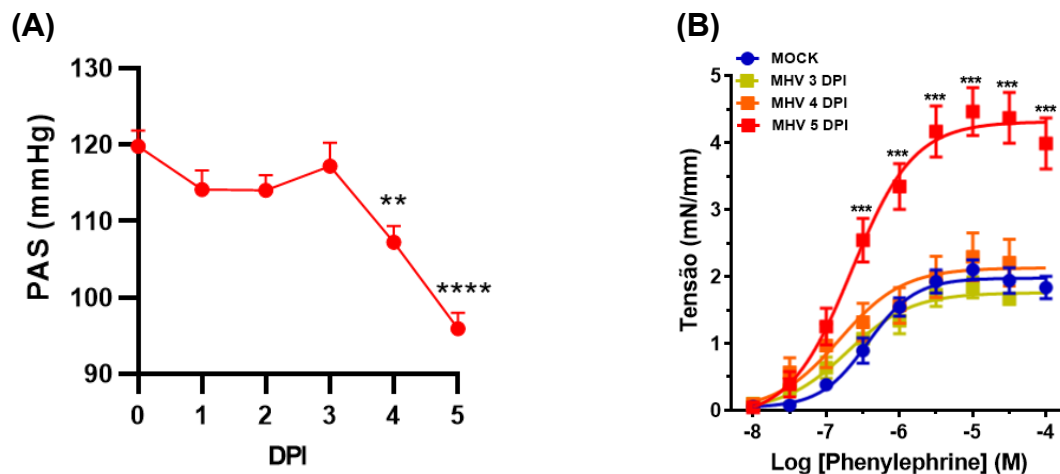


FIGURA 13 - A infecção com MHV-3 induz a diminuição da pressão arterial e o aumento da contração vascular na artéria mesentérica. (A) Pressão arterial sistólica ao longo do tempo da infecção por MHV-3. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. ***p<0,001 e ****p<0,0001. (B) Curva de concentração-resposta a Fen ao longo do tempo na artéria mesentérica dos grupos MOCK e MHV-3. ***p<0,001.

As veias regulam o retorno venoso, um dos fatores que contribuem para a determinação da pressão arterial (TANSEY et al., 2019). Por conseguinte,

investigamos as repercussões causadas pela infecção pelo MHV-3 na veia cava. Estes experimentos foram feitos no 5 DPI com base nos resultados obtidos na aorta e artéria mesentérica. A infecção provocou diminuição na contratilidade da veia cava nos animais infectados ($n = 6$) quando comparado ao controle ($n = 6$; **GRÁFICO 2**).

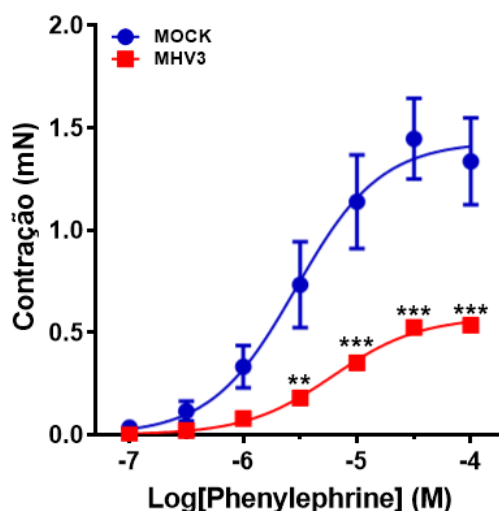


GRÁFICO 2 – A infecção com MHV-3 induz diminuição da contração na veia cava. Curva de concentração-resposta a Fen ao longo do tempo na veia cava inferior dos grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$.

O impacto das disfunções vasculares ocasionadas ao longo do período de infecção, sobre a perfusão sanguínea, também foi avaliado (**FIGURA 14A**). As medidas do doppler revelaram que no 5DPI os animais infectados apresentaram diminuição da perfusão em ambas as regiões, patas ($568,6 \pm 143,0$ a.u.; $n = 4$; $p < 0,0001$; **FIGURA 14B**) e cauda ($411,7 \pm 85,23$ a.u.; $n = 6$; $p = 0,0008$; **FIGURA 14C**) quando comparado ao 0 DPI (pata $2773,0 \pm 54,53$ a.u.; $n = 10$ - cauda $672,3 \pm 32,37$ a.u.; $n = 10$). Não foram observadas mudanças de fluxo sanguíneo no 3 e 4 DPI.

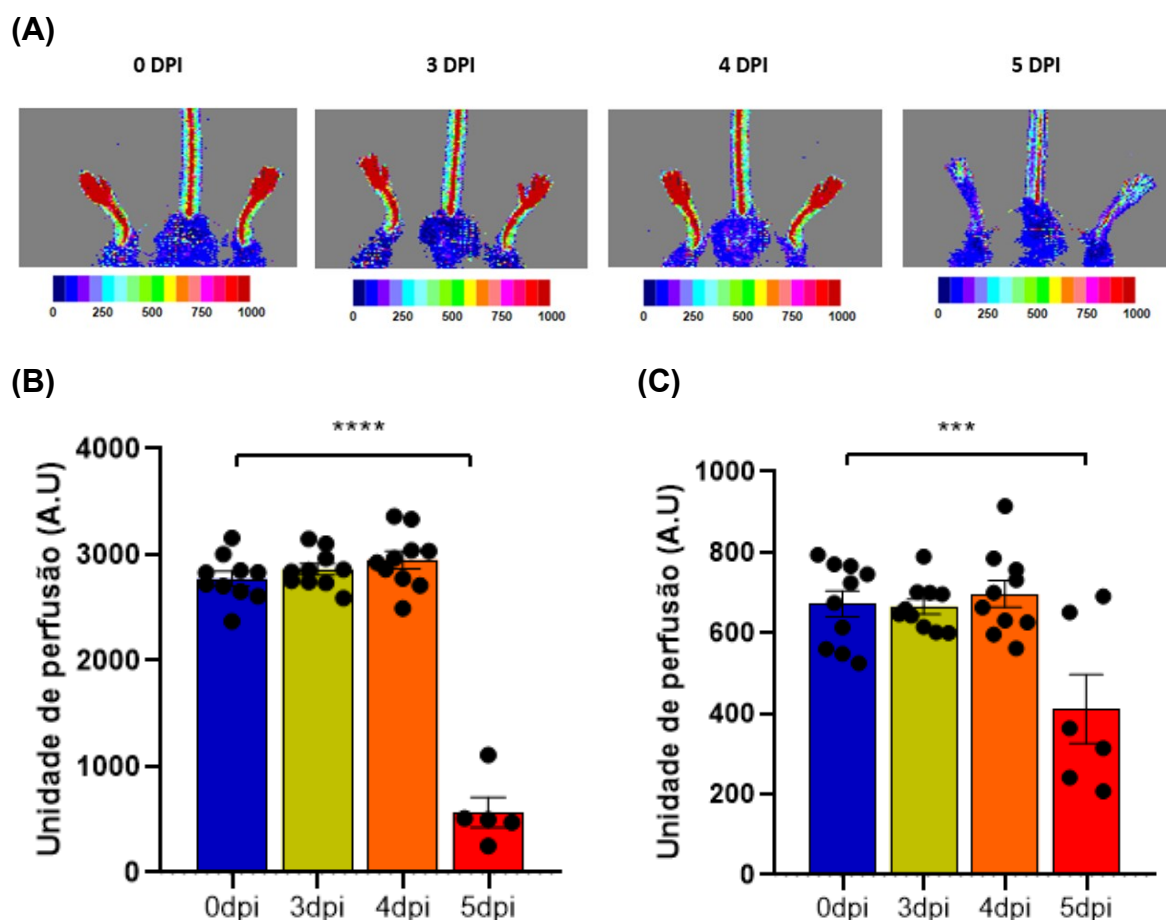


FIGURA 14 - A infecção por MHV-3 promove diminuição do fluxo sanguíneo. (A) Figura representativa da perfusão tecidual ao longo do tempo nos animais infectados com MHV-3 nas patas e base da cauda. As cores mais quentes indicam maior fluxo sanguíneo. (B) Representação gráfica do fluxo ao longo do tempo nas patas. (C) Representação gráfica do fluxo ao longo do tempo na cauda. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.7 AS DISFUNÇÕES VASCULARES E AS REPERCUSSÕES SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FLUXO SANGUÍNEO CAUSADAS PELA INFECÇÃO DO MHV-3, SÃO MEDIADOS POR TNF

A citocina TNF tem papel fundamental na expressão da iNOS e NADH oxidase, enzimas que contribuem para as disfunções vasculares mencionadas acima (PICCHI et al., 2006; LIANG et al., 2014). Além disso, o TNF já foi associado à patogênese sistêmica da infecção intranasal pelo MHV-3 (ANDRADE et al., 2021). Desta maneira, o papel do TNF foi investigado.

Inicialmente fez-se a dosagem da citocina no plasma (**FIGURA 15A**) e na artéria aorta (**FIGURA 15B**). Tanto no plasma (MOCK $243,7 \pm 16,82$ pg/ml; MHV-3 $2239 \pm 280,1$ pg/ml; $n = 4$; $p = 0,0004$), quanto na aorta (MOCK $1846 \pm 145,1$ pg/ml;

MHV-3 $2433 \pm 184,2$ pg/ml; $n = 6$; $p = 0,0312$) o grupo MHV-3 apresentou maior concentração da citocina, quando comparado ao MOCK.

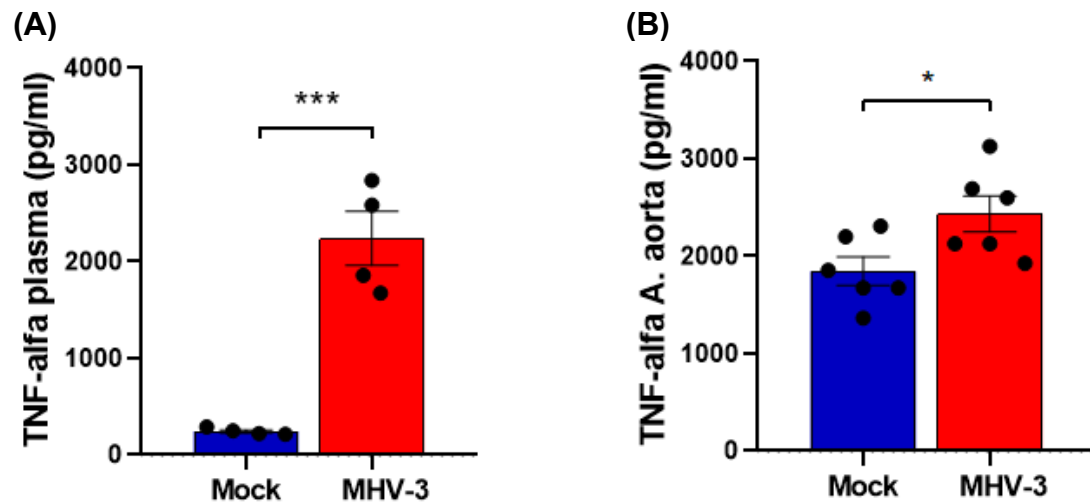


FIGURA 15 - A infecção pulmonar por MHV-3 aumenta a produção de TNF no plasma e na aorta. (A) Representação gráfica da concentração de TNF no plasma (5DPI). (B) Representação gráfica da concentração de TNF na aorta (5DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ e *** $P < 0,0005$.

Em seguida, a expressão da subunidade p65 do NF- κ B, o principal regulador das respostas transcricionais do TNF, foi avaliada por imunofluorescência (**FIGURA 16A**) (ABLAMUNITIS, LEPSY, 2022). O experimento evidenciou maior expressão do regulador no grupo MHV-3 ($10,84 \pm 0,77$ a.u.; $n = 6$), quando comparado ao MOCK ($1,543 \pm 0,30$ a.u.; $n = 5$; $p < 0,0001$), indicando que a via NF- κ B/TNF é ativada na infecção pelo MHV-3 (**FIGURA 16B**).

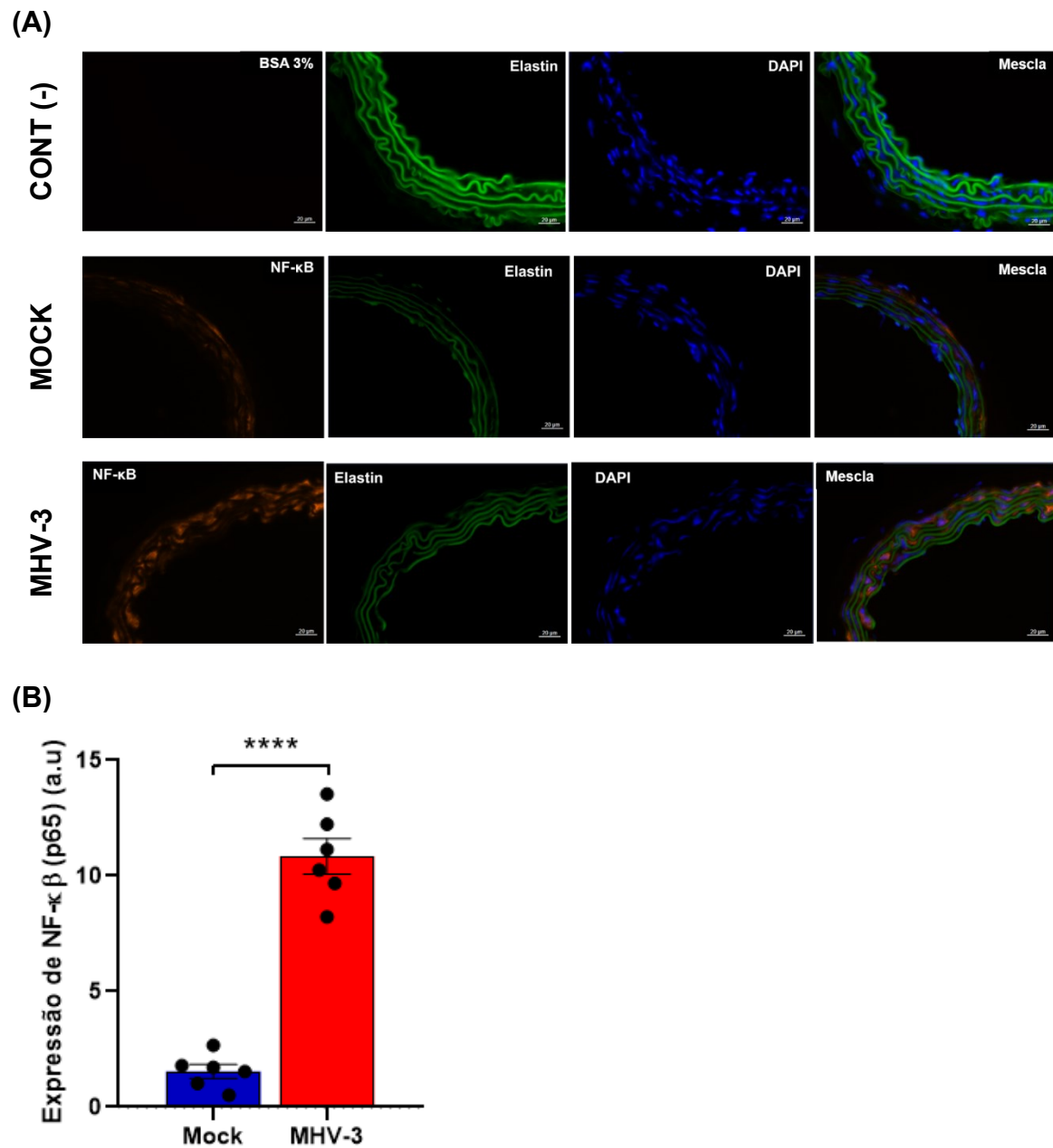


FIGURA 16 - A Infecção pelo MHV-3 induz a expressão do NF-κB na aorta. (A) Figura representativa da imunofluorescência para NF-κB na aorta dos grupos MOCK, MHV-3 e controle negativo (5DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida, que reflete a expressão de NF-κB na aorta. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. **** $p < 0,0001$.

Para melhor avaliação da participação do TNF na infecção, animais knockout para o receptor TNFR1, TNFR1^{-/-}, foram infectados ou não com MHV-3 (MOCK TNFR1^{-/-}, MHV-3 TNFR1^{-/-}). A sobrevivência foi avaliada e os animais não apresentaram mortalidade em decorrência da infecção ($n = 5$; **FIGURA 17A**). O NF-κB, novamente foi avaliado por imunofluorescência (**FIGURA 17C**). O experimento evidenciou que em ambos os grupos, MOCK TNFR1^{-/-} ($1,307 \pm 0,27$ a.u.; $n = 4$) e MHV-3 TNFR1^{-/-}

($1,42 \pm 0,26$ a.u.; $n = 4$; $p = 0,68$), a intensidade de fluorescência não foram significativamente diferentes (**FIGURA 17B**).

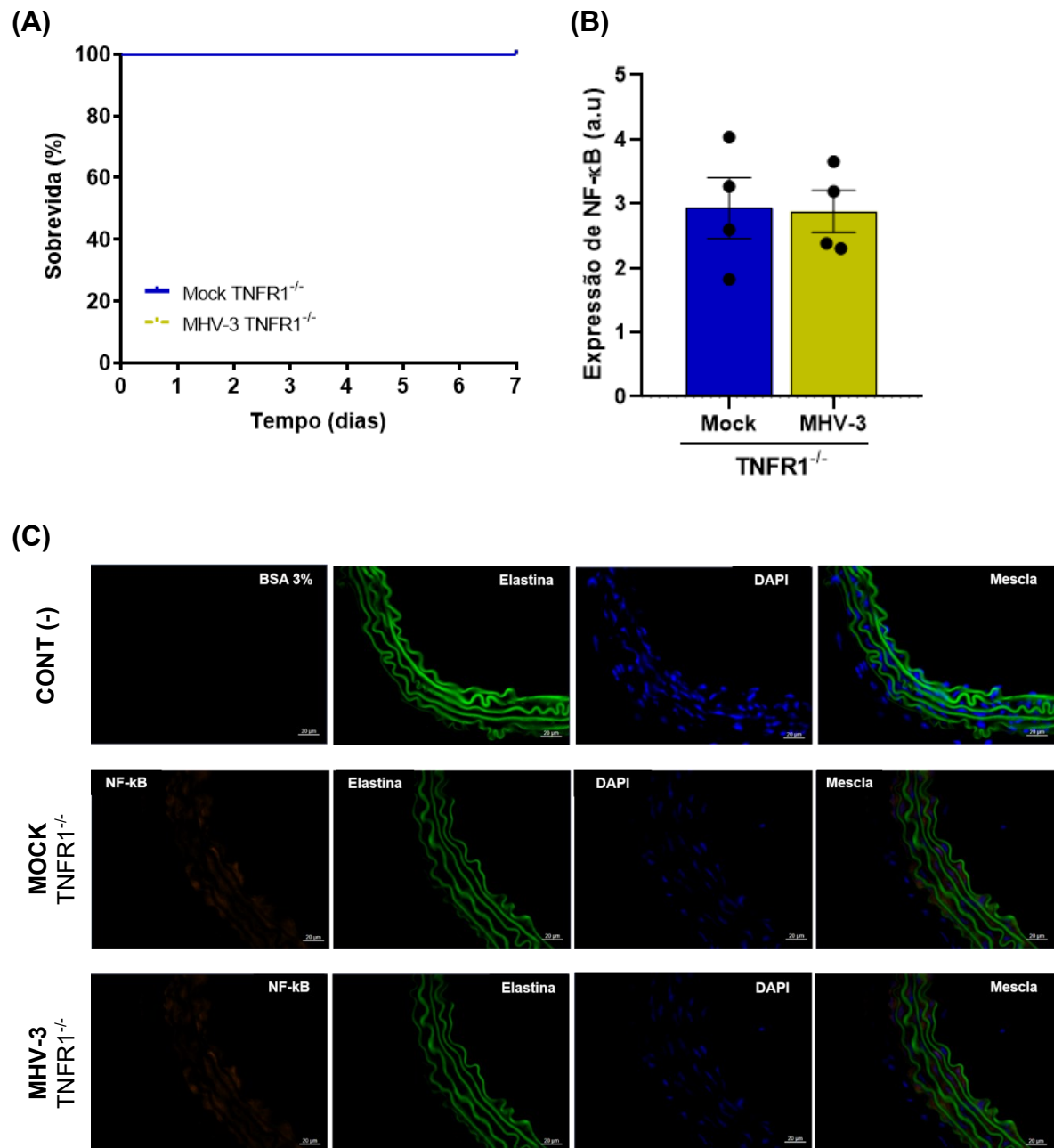


FIGURA 17 - A deleção do gene que expressa o receptor TNF1 (TNFR1^{-/-}) previne a mortalidade e o aumento na expressão do NF-κB pelo MHV-3. (A) Representação gráfica das taxas de sobrevivência dos animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK e MHV-3. (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida, que reflete expressão de NF-κB na aorta de animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK, MHV-3. (C) Figura representativa da imunofluorescência para NF-κB na aorta de animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK, MHV-3 e controle negativo. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM.

As repercussões contráteis na artéria aorta também foram avaliadas nos animais $TNFR1^{-/-}$. Observou-se que a supressão genética do receptor foi capaz de igualar os valores de contração entre os grupos MOCK $TNFR1^{-/-}$ ($n = 3$) e MHV-3 $TNFR1^{-/-}$ ($n = 4$; **GRÁFICO 3**).

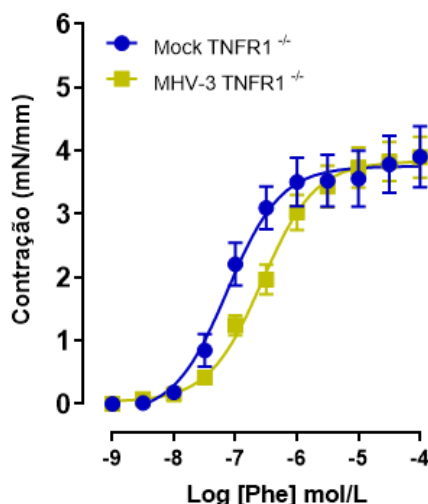


GRÁFICO 3 - O deleção gênica do receptor TNF1 ($TNFR1^{-/-}$) previne a disfunção contrátil na aorta provocada pela infecção com o MHV-3. Curva concentração-resposta cumulativa a Fen na aorta dos animais, $TNFR1^{-/-}$, grupos MOCK e MHV-3 (5 DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM.

A produção de NO também foi avaliada em camundongos nocauteados para TNF (**FIGURA 18A**). O grupo MHV-3 $TNFR1^{-/-}$ ($33,9 \pm 2,20$ a.u.; $n = 5$) apresentou intensidade de fluorescência menor quando comparada ao MOCK $TNFR1^{-/-}$ ($45,53 \pm 2,25$ a.u.; $n = 4$; $p = 0,028$; **FIGURA 18B**), sugerindo que a infecção por MHV-3 possivelmente tem um efeito secundário na produção de NO além de $TNFR1$, que não está relacionado a diminuição da contratilidade vascular, já que o nível de contração se normalizou. A iNOS foi também mensurada (**FIGURA 18D**). Em ambos os grupos, MOCK $TNFR1^{-/-}$ ($1,307 \pm 0,27$ a.u.; $n = 4$) e MHV-3 $TNFR1^{-/-}$ ($1,42 \pm 0,26$ a.u.; $n=5$; $p = 0,68$), as intensidades de fluorescência foram idênticas (**FIGURA 18C**). Em síntese, os dados mostram que o TNF medeia a disfunção contrátil induzida por MHV-3, aumentando a produção de NO vascular através de TNF/NF- κ B /iNOS.

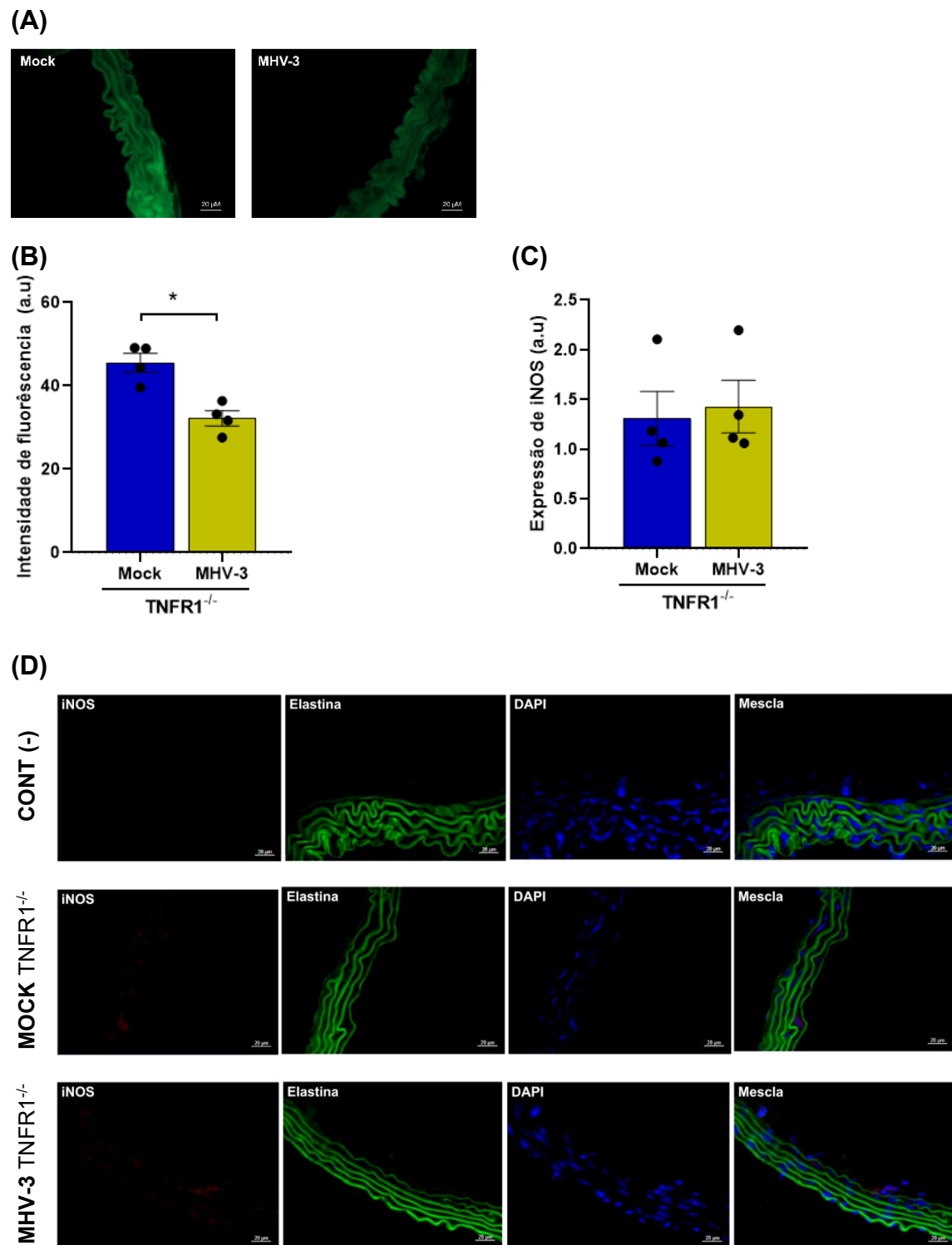


FIGURA 18 - A deleção gênica do receptor TNF1 ($TNFR1^{-/-}$) previne o aumento da produção de NO vascular e da expressão da iNOS induzida pela infecção com o MHV-3. (A) Figura representativa da fluorescência da sonda DAF na aorta de animais $TNFR1^{-/-}$, grupos MOCK, MHV-3 e controle negativo (5DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DAF, que reflete a quantidade de NO presente na aorta de animais $TNFR1^{-/-}$, grupos MOCK, MHV-3. (C) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida, que reflete a expressão de iNOS na aorta de animais $TNFR1^{-/-}$. (D) Figura representativa da imunofluorescência para iNOS na aorta dos

grupos, TNFR1^{-/-} MOCK, TNFR1^{-/-} MHV-3 e controle negativo (5DPI). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. *p<0,05

A influência da supressão gênica do TNFR1 sobre o estresse oxidativo foi avaliada nos animais TNFR1^{-/-}, grupos MOCK e MHV-3 (**FIGURA 19A**). Os dois grupos, MOCK TNFR1^{-/-} (16,98 $\pm$ 2,74 a.u.; n = 4) e MHV-3 TNFR1^{-/-} (14,51 $\pm$ 1,74 a.u.; n = 5; p = 0,45), não apresentaram diferença significativa na produção ROS (**FIGURA 19B**). As repercussões vasodilatadoras do nocauteamento do TNFR1 na aorta, também foram avaliadas (**FIGURA 19C**), tendo os grupos MOCK TNFR1^{-/-} (n = 3) e MHV-3 TNFR1^{-/-} (n = 5) apresentaram índices de relaxamento semelhantes quando comparados.

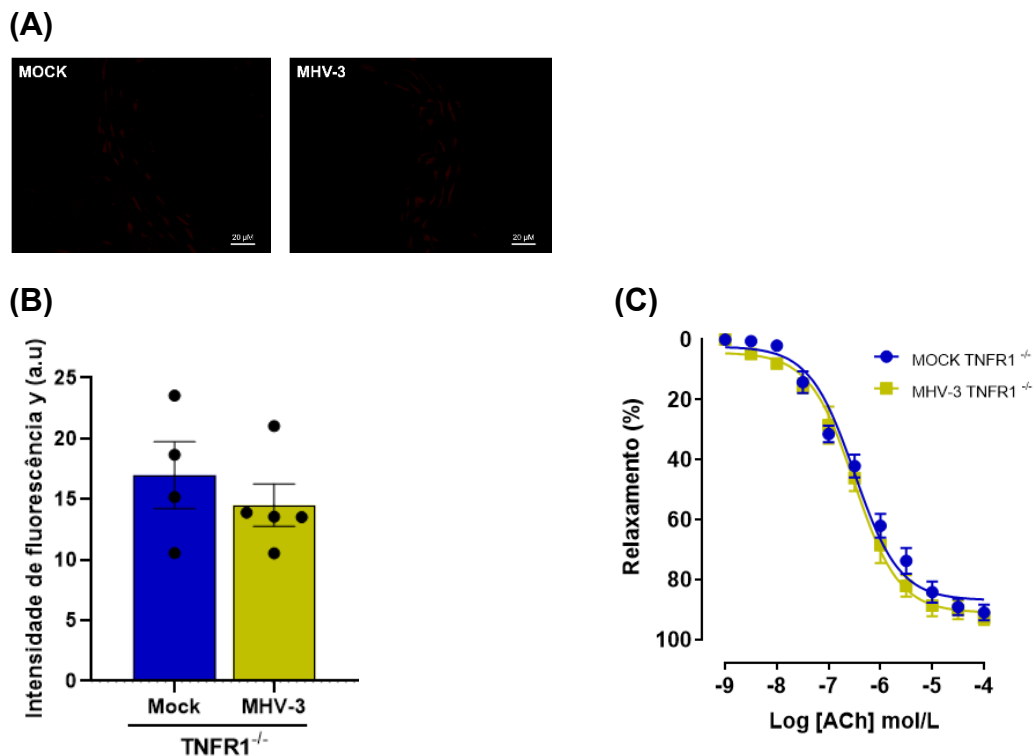


FIGURA 19 - A supressão gênica do receptor TNF1 (TNFR1^{-/-}) previne o estresse oxidativo e a consequente disfunção do relaxamento vascular na aorta. (A) Figura representativa da fluorescência da sonda DHE na aorta dos animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK, MHV-3 e controle negativo (5DPI). (B) Representação gráfica da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE, que reflete a quantidade de ROS presente na aorta dos animais, TNFR1^{-/-}. (C) Curva concentração-resposta cumulativa a ACh na aorta dos animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK, MHV-3. FIGUOs dados foram expressos como média $\pm$ EPM.

A contratilidade da veia cava foi estudada perante a deleção do gene do receptor TNFR1, e os grupos, MOCK TNFR1^{-/-} (n = 3) e MHV-3 TNFR1^{-/-} (n = 5) foram

comparados (**GRÁFICO 4**). A supressão do gene foi capaz de evitar a disfunção contrátil no vaso.

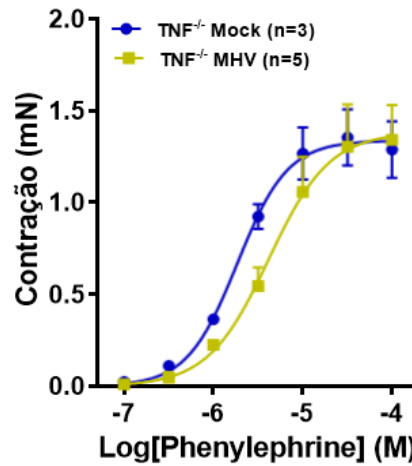


GRÁFICO 4 - A supressão genética do receptor TNF1 (TNFR1^{-/-}) evitou a disfunção vascular contrátil na veia cava. Curva concentração-resposta cumulativa a ACh na aorta dos animais, TNFR1^{-/-}, grupos MOCK, MHV-3 (5 DPI). Os dados foram expressos como média ± EPM.

A perfusão sanguínea também foi avaliada em camundongos TNFR1^{-/-} (n = 3 - 5; **FIGURA 20A**). Em ambas as regiões, patas (n = 3 - 5; **FIGURA 20B**) e cauda (n = 3 - 5; **FIGURA 20C**), os valores obtidos foram similares em todos os dias em que foi mensurada, indicando manutenção da perfusão sanguínea local, na supressão do receptor TNF1.

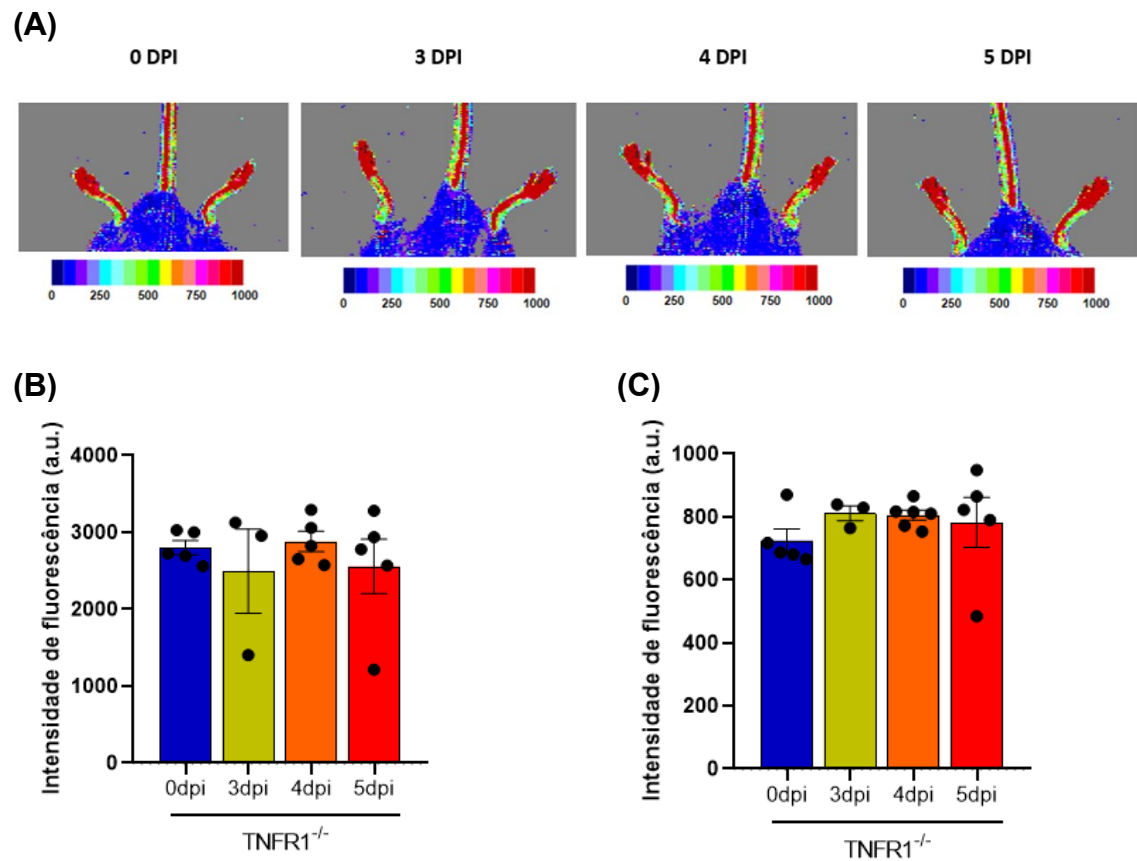


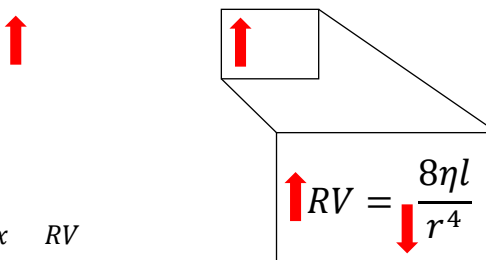
FIGURA 20 - A deleção gênica do receptor 1 do TNF previne a diminuição do fluxo sanguíneo periférico causado pela infecção por MHV-3. (A) Figura representativa da perfusão tecidual ao longo do tempo nos animais TNFR1^{-/-} infectados com MHV-3 nas patas e base da cauda. As cores mais quentes indicam maior fluxo sanguíneo. (B) Representação gráfica do fluxo ao longo do tempo nas patas. (C) Representação gráfica do fluxo ao longo do tempo na cauda. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM.

6. DISCUSSÃO

O endotélio desempenha um papel fundamental no controle do tônus vascular, na fibrinólise, na coagulação e na resposta imune (DEANFIELD, HALCOX, RABELINK, 2007). Evidências crescentes sugerem que a disfunção endotelial é uma característica central da COVID-19, uma vez que o SARS-CoV-2 pode causar dano endotelial, tanto indiretamente por meio da resposta imune sistêmica, quanto diretamente por meio da infecção de células vasculares (HUANG et al., 2020; HUERTAS et al., 2020; GIORDO et al., 2021; LIU et al., 2021; RUHL et al., 2021). É interessante notar que a disfunção endotelial é comum às principais comorbidades associadas a piores prognósticos em pacientes com COVID-19 (HUANG et al., 2020; HUERTAS et al., 2020; RUHL et al., 2021). No entanto, embora a literatura traga algumas informações a respeito do papel do endotélio na Covid-19, pouco se sabe sobre os efeitos da infecção por coronavírus no tônus vascular, suas consequências hemodinâmicas e os mecanismos subjacentes. Dessa forma, neste trabalho investigamos os mecanismos moleculares relacionados à disfunção do tônus vascular em animais infectados com betacoronavírus. Igualmente, avaliamos a correlação das disfunções vasculares com a pressão arterial, o fluxo sanguíneo e a mortalidade.

O presente estudo mostrou que a infecção intranasal de camundongos com o betacoronavírus MHV-3, causou uma importante disfunção vascular contrátil, cujas características são diferentes dependendo do modelo vascular estudado. Foi observado na artéria aorta e na veia cava dos camundongos infectados, diminuição acentuada da contratilidade vascular, em resposta à estimulação farmacológica dos receptores α 1-adrenérgicos com fenilefrina. Por outro lado, o mesmo estímulo produziu um grande aumento da contratilidade nas artérias mesentéricas de resistência. Apesar disso, foi observado também, hipotensão severa a partir do 4 DPI e diminuição do fluxo sanguíneo periférico, previamente a morte dos animais. As artérias de resistência apresentam um relevante papel no controle da pressão arterial, uma vez que a pressão é diretamente proporcional a resistência vascular, que por sua vez é inversamente proporcional à quarta potência ao valor do raio (**FIGURA 21**) (FINK, 2008; MOREIRA, 2008; OISETH, JONES, MAZA, 2022). Ou seja, segundo os resultados apresentados, a diminuição do raio, em decorrência do aumento da contração observado nas artérias de resistência, resulta no aumento na resistência

vascular e, conseqüentemente, levaria ao aumento da pressão. Logo a hipotensão não pode ser resultado da disfunção de contração apresentada por estas artérias.



$$Pas = DC \times RV$$

$$RV = \frac{8\eta l}{r^4}$$

FIGURA 21 – Relação pressão e diminuição do raio segundo as leis de mecânica de fluidos. Fórmulas que relacionam raio com a resistência vascular e com a PAS. Pressão arterial sistólica (PAS), Débito cardíaco (DC), Resistência vascular (RV), Viscosidade (η), Comprimento (l) e Raio (r).

Fonte: Adaptado de MOREIRA, 2008; OISETH, JONES, MAZA, 2022.

O tônus tanto da aorta e das veias são importantes para a manutenção do fluxo sanguíneo e da oxigenação dos tecidos (LONDON, GUERIN, 1999; GELMAN, 2008; VOGES et al., 2012; TANSEY et al., 2019). A aorta em decorrência da regulação da velocidade da onda de pulso e as veias por meio da sua contribuição para a manutenção do retorno venoso e do débito cardíaco (LONDON, GUERIN, 1999; GELMAN et al., 2008; FINK, 2009). Logo, alterações na velocidade da onda de pulso bem como no retorno venoso, ocasionados pela disfunção contrátil apresentada por estes vasos, podem estar associados a queda da pressão arterial apresentada pelos animais infectados com o MHV-3.

O fluxo sanguíneo por sua vez, é também diretamente influenciado pelo gradiente de pressão arterial (ΔP) (**FIGURA 22**) (MOREIRA, 2008; OISETH, JONES, MAZA, 2022). Logo, a diminuição do gradiente de pressão arterial, quando por exemplo a pressão arterial diminui na aorta, é capaz de levar a hipoperfusão tecidual. Neste sentido, condições patológicas relacionadas a venoplegia, ou incapacidade das veias de contraírem, pode levar a um déficit de retorno venoso, conseqüente diminuição do débito cardíaco e queda de pressão arterial. Além disso, o fluxo sanguíneo pode estar ainda mais reduzido por conta de uma diminuição no raio das artérias de resistência, ocasionado pelo aumento da sua contração. Tal pois, o fluxo sanguíneo é inversamente proporcional a resistência vascular, que, por sua vez é inversamente proporcional à quarta potência ao valor do raio (**FIGURA 22**) (MOREIRA, 2008; OISETH, JONES, MAZA, 2022). Ou seja, se o raio diminuir, a resistência vascular aumenta e o fluxo diminui. É digno de nota, a redução drástica

do fluxo sanguíneo periférico observada no 5 DPI que coincidiu com o aumento súbito da contração das artérias mesentéricas de resistência, que ocorre previamente a morte dos animais, indicando potencial participação das artérias de resistência na redução do fluxo sanguíneo.

$$F = \frac{\Delta P}{RV}$$

$$RV = \frac{8\eta l}{r^4}$$

FIGURA 22 – Relação fluxo e raio segundo as leis de mecânica de fluidos. Fórmulas que relacionam raio com a resistência vascular e com o fluxo. Em azul, relação entre o fluxo (F) e o gradiente de pressão arterial (ΔP). Em vermelho, relação entre fluxo (F) e o raio (r). Fluxo (F), Gradiente de pressão (ΔP), Resistência vascular (RV), Viscosidade (η), Comprimento (l) e Raio (r).

Fonte: Adaptado de MOREIRA, 2008; OISETH, JONES, MAZA, 2022.

No geral, os dados do presente estudo sugerem que a hipotensão, a diminuição do fluxo sanguíneo e a morte dos animais são causadas, principalmente, pelas macroartérias e veias hiporresponsivas. E ainda, o aumento da contratilidade das artérias de resistência parecer dar uma contribuição adicional para a queda do fluxo sanguíneo e morte. Assim sendo, as diferenças na reatividade nos três leitos vasculares estudados desencadeadas pela infecção pelo MHV-3, contrastam com a vasoplegia generalizada encontrada em infecções e outras condições onde a sepse é detectada (LAMB DEN et al., 2018). Neste sentido, é provável que a infecção pelo betacoronavírus MHV-3 imponham uma situação hemodinâmica mais complexa, que pode ser mais difícil de estabilizar.

A infecção pelo MHV-3 diminuiu a contração vascular exclusivamente através do endotélio, uma vez que sua remoção restaurou a contratilidade e não foram observadas disfunções contráteis no músculo liso ao ser testado com o KCl, ao contrário da disfunção contrátil induzida pela sepse, que ocorre devido à disfunção em ambas as regiões dos vasos (LAMB DEN et al., 2018). O NO é o mais bem descrito EDRF que participa do controle do tônus vascular (VANHOUTTE et al., 2015; FARAH, MICHAEL, BALLIGAND, 2018). A sua superprodução tem sido associada à diminuição da contratilidade vascular (CHUAIPHICHAH et al., 2016). Neste trabalho observamos que a produção basal de NO foi aumentada na aorta de animais

infectados por MHV-3 e SARS-CoV-2. Além disso, a inibição da produção de NO com o inibidor não seletivo de NOS, o L-NNA e o uso do carboxi-PTIO, um sequestrador de NO, restauraram a contratilidade da aorta dos animais infectados pelo MHV-3, aos níveis dos animais controle. Portanto, é provável que a infecção por betacoronavírus induza o aumento na produção de NO basal, que é responsável pela hiporresponsividade. Uma das principais características da patogênese sistêmica da infecção por betacoronavírus é o aumento das citocinas pró-inflamatórias plasmáticas e danos nos tecidos extrapulmonares (GUPTA et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). Sabe-se que sob condições inflamatórias, a expressão da iNOS torna-se elevada e com isso a produção basal de NO pode aumentar (LOWRY et al., 2013). Os dados de imunofluorescência do presente estudo mostraram que a infecção por MHV-3 e SARS-CoV-2 aumentaram a expressão da iNOS. Vale ressaltar que a inibição farmacológica seletiva da iNOS com 1400W e a deleção genética do gene da iNOS, restauraram a resposta contrátil de camundongos infectados com MHV-3 ao nível do controle. Em conjunto, nossos dados mostram que o aumento da produção de NO derivado de iNOS é responsável pela diminuição da contratilidade observada em camundongos infectados com betacoronavírus.

O aumento da expressão da iNOS comumente está associada à indução do estresse oxidativo (ZHANG et al., 2009). O estresse oxidativo corresponde ao desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, devido a produção excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecido (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al. 2010). Além disso, várias condições comorbóticas importantes associadas à COVID-19 grave, são caracterizadas por estresse oxidativo e diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio deficiente (PICCHI et al., 2009; ZHANG et al., 2009; ASSAR, ÂNGULO, RODRÍGUEZ-MAÑAS, 2016; NÄGELE et al., 2020; HANZU et al., 2011; GALLO, MASSIMO, SAVOIA, 2021). Os nossos resultados demonstraram disfunção vasodilatadora na aorta de camundongos infectados com MHV-3. A disfunção foi marcada pela diminuição do relaxamento induzido pela ACh, em decorrência do aumento na produção de ROS, uma vez que a remoção do mesmo por Tiron normalizou a função vasodilatadora. As NADPH

oxidases são uma importante fonte para a formação de ROS nos vasos sanguíneos (GUO et al., 2022). Elas são uma família de enzimas que geram ROS transferindo elétrons para a molécula de oxigênio e a subunidade Gp91phox da NADPH é crucial para a formação desse ânions superóxidos (ZENG et al., 2022). A deleção genética da subunidade Gp91phox do NADPH, também normalizou o relaxamento vascular da aorta de camundongos infectados com MHV-3, porém, não reverteu a mortalidade provocada pela infecção. Juntos, estes resultados evidenciam que o aumento de ROS via NADPH oxidase está envolvido na diminuição do relaxamento a ACh na aorta dos animais infectados, mas não são a causa da morte.

Uma das principais características da patogênese da infecção por betacoronavírus é o aumento das citocinas pró-inflamatórias no plasma (GUPTA et al., 2020; ANDRADE et al., 2021). O TNF é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias associadas a danos nos tecidos e que participa da expressão de genes envolvidos na inflamação, no estresse oxidativo e em coagulopatias, características importantes da patogênese da COVID-19 (ZHANG et al., 2009; HAYDEN, GHOSH, 2014; JIA et al., 2021). Além disso, o TNF é uma citocina chave para a disposição dos fatores que culminam na tempestade de citocinas, observada com frequência nesta doença (HOJYO et al., 202; JIA et al., 2021; ABLAMUNITS, LEPSY, 2022). De acordo com as descobertas deste estudo, a produção de TNF foi aumentada tanto no plasma, quanto na aorta de animais infectados pelo MHV-3. O MHV-3 sai dos pulmões e infecta diretamente os vasos sanguíneos. Diante disso, o aumento da produção vascular de TNF encontrado no presente estudo pode ser causado por uma resposta do endotélio vascular ao processo inflamatório sistêmico desencadeado pela infecção pelo MHV-3. Em linha com esta ideia, foi relatado que a administração intravenosa de TNF aumentou a produção de citocinas inflamatórias pelas células endoteliais na artéria mesentérica de ratos (ZENG et al., 2022). Ainda, pode ser resultado da infecção direta das células vasculares pelo vírus, conforme já relatado para as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e a linhagem celular endotelial da microvascular dérmica humana (HMEC-1) que foram infectadas com SARS-CoV-2 (QIAN et al., 2021; DOLCI et al., 2022). Independentemente de como ocorre, a produção vascular de TNF pode contribuir para elevações sistêmicas da citocina.

O NF- κ B desempenha um papel importante como regulador das respostas transcricionais mediadas pelo TNF (HAYDEN, GHOSH, 2014). Trata-se de um complexo proteico associado à transcrição gênica, ativação de enzimas relacionadas à sobrevivência e produção de citocinas inflamatórias (LIU et al., 2017). Estudos recentes mostraram que a sinalização mediada pelo NF- κ B está associada a tempestades de citocinas em pacientes com COVID-19 (HARIHARAN et al., 2021). Consistente com as evidências acima, no presente estudo, mostramos que a expressão de NF- κ B está aumentada na aorta de camundongos infectados com MHV-3. Além disso, a deleção genética do receptor R1 para o TNF impediu o aumento da expressão de NF- κ B. Esses dados suportam a ideia de que o NF- κ B é uma via a jusante na disfunção vascular mediada por TNF induzida pela infecção por MHV-3.

De modo geral o TNF é conhecido por estimular a expressão de iNOS (LIANG et al., 2014). Já se é sabido também que estímulos contendo citocinas pró-inflamatórias, como TNF, são capazes de aumentar a expressão de iNOS por meio da ativação do NF- κ B em células endoteliais (CORTESE-KROTT et al., 2014; LIU et al., 2017). Além disso, foi mostrado que o silenciamento da p65 do NF- κ B, a subunidade mais abundante envolvida na via de sinalização inflamatória, reduziu a expressão de iNOS em até 99% (CORTESE-KROTT et al., 2014; LIU et al., 2017). No presente estudo, a deleção genética do TNFR1 impediu o aumento da expressão de iNOS causada pela infecção com os betacoronavírus, bem como a diminuição da contratilidade mediada pela iNOS/NO induzida pelo MHV-3. Além disso, o nocauteamento do TNFR1, impediu a diminuição do fluxo sanguíneo e a consequente, a morte dos animais.

A NADPH oxidase é uma das vias mais comuns pelas quais o TNF aumenta a produção de ROS (PICCHI et al., 2006). Em várias linhagens celulares, a expressão de gp91phox e a produção de ROS foram mostradas como dependentes da ativação da subunidade p65 do NF- κ B (ANRATHER, RACCHUMI, IADECOLA, 2006). Em camundongos TNFR1^{-/-}, a produção de ROS e o relaxamento vascular retornaram aos níveis dos camundongos controle. Semelhante aos nossos resultados, foi relatado que o TNF aumenta a produção de ROS e prejudica o relaxamento vascular (ZHANG et al., 2009). Em conjunto, os nossos resultados mostraram que o nocauteamento do TNFR1 reverteu o aumento na expressão de NADPH oxidase causada pela infecção com os betacoronavírus, bem como a disfunção de relaxamento vascular mediado

pela NADPH oxidase/ROS induzida pelo MHV-3. Corroborando nossas descobertas, a função endotelial é prejudicada em condições inflamatórias sistêmicas associadas ao aumento da produção de TNF plasmático, como sepse e síndromes metabólicas (PICCHI et al., 2006; LIANG et al., 2014; DOLMATOVA et al., 2021). Além disso, o bloqueio de TNFR1 melhorou a função endotelial na artrite reumatóide, obesidade e insuficiência cardíaca (FICHTLSCHERER et al., 2001; CARDILLO et al., 2006; TOTOSON et al., 2016; RĂZVAN-VALENTIN et al., 2022). Posto isso, estes dados apoiam a ideia de que a regulação da via TNF/NF- κ B pode ser a responsável pelas disfunções vasculares, tanto de contração quanto de vasodilatação, mediadas pelo MHV-3.

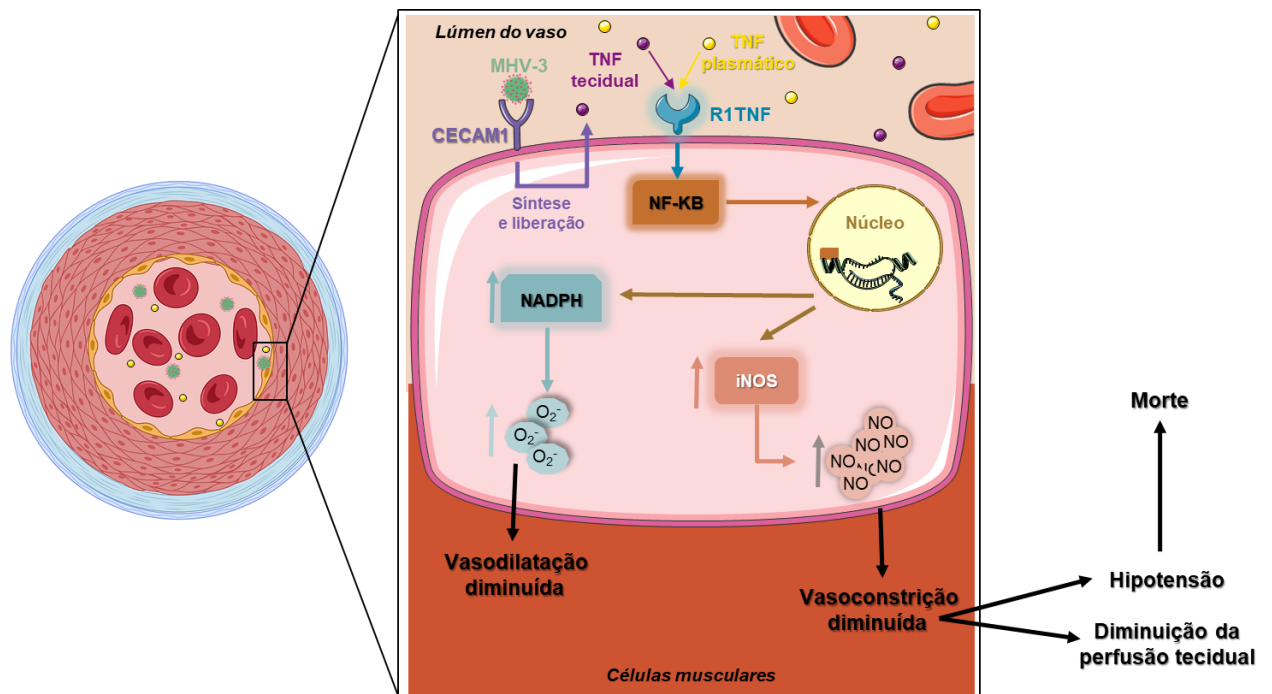


FIGURA 23 – Gráfico abstract. A infecção pulmonar com o MHV-3 foi capaz de desencadear via TNF/NF- κ B/iNOS, o aumento do NO basal, que é responsável pela diminuição da contratilidade vascular na artéria aorta e na veia cava, que se relaciona com a diminuição da pressão arterial, diminuição da perfusão sanguínea tecidual, falência circulatória e morte, e via TNF/NF- κ B/NADPH ocorre o aumento na produção de ROS que leva a um relaxamento vascular prejudicado.

CONCLUSÃO

A infecção pulmonar com betacoronavírus é capaz de desencadear duas disfunções vasculares diferentes dependentes do endotélio, através da via de sinalização TNF/NF-KB. A primeira, é mediada pelo aumento do NO basal derivado da iNOS, que é responsável pela disfunção da contratilidade vascular dependente do endotélio na artéria aorta e na veia cava. Esta disfunção está relacionada com a diminuição da pressão arterial, diminuição da perfusão sanguínea tecidual, falência circulatória e morte, através da via TNF/NF-B/iNOS. Estes resultados demonstram o papel fundamental do sistema vascular na letalidade dos betacoronavírus, revelam e os mecanismos subjacentes. A segunda, ocorre como resultado de um aumento na produção de ROS dependente de NADPH, que leva a um relaxamento vascular prejudicado, por intermédio da via TNF/NF-KB/NADPH. Este tipo de disfunção endotelial está presente em pacientes idosos e em pacientes com hipertensão, diabetes e obesidade. Portanto, apesar da disfunção de relaxamento, aparentemente, não contribuir com a mortalidade no modelo estudado, ela pode contribuir com as sequelas cardiovasculares na síndrome pós-COVID, principalmente, em pacientes com comorbidades. Finalmente, os nossos resultados destacam o TNF/TNFR1 como um alvo terapêutico potencial para o tratamento de complicações vasculares causadas pela infecção por beta coronavírus.

REFERÊNCIAS

- ABLAMUNITS, V.; LEPSY, C. **Blocking TNF signaling may save lives in COVID-19 infection**. Molecular Biology Reports, v. 49, p. 2303-2309, 2022. Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/358107921_Blocking_TNF_signaling_may_save_lives_in_COVID-19_infection>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.
- ANDRADE, A. C. D. S. P. et al. **A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations**. Journal of Virology, v. 95, n. 22, p. 2021. Disponível em <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.01276-21?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org>. Acessado em: 17 de jul. de 2022
- ANRATHER, J.; RACCHUMI, G.; IADECOLA, C. **NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox**. Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 9, p. 5657-5667, 2006. Disponível em <[https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)76692-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)76692-7/fulltext)>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.
- ASSAR, M. E.; ÂNGULO, J.; RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. **Diabetes and ageing-induced vascular inflammation**. The Journal of Physiology, v. 594, n. 8, p. 2125-2146, 2016. Disponível em <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/JP270841>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.
- BARBOSA, K. B. F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de nutrição, v. 23, n. 4, p. 629 - 643, 2010. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/rn/a/Fvg4wkYjZPgsFs95f4chVjx/abstract/?lang=pt>>. Acessado em 26 de dez. de 2022.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Química nova, v. 29, n. 1 p. 113 - 123, 2006. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/qn/a/K9hDbHkb3D3KPkgpLz7fg7k/>>. Acessado em 26 de dez. de 2022.
- BONAVENTURA, A. et al. **Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19**, Nature Reviews Immunology, v. 21, n. 5, p. 319-329, 2021. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41577-021-00536-9>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.
- BRASIL. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA**. Brasil, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA, v. 1, p. 1–50, 2016. Disponível em <https://propp.ufms.br/files/2021/05/DBCA_RN.30.pdf>. Acessado em: 11 de nov. de 2022.

CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. **Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta**. *European Journal of Pharmacology*, v. 643, n. 2-3, p. 206-266, 2010. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910006758?via%3Dihub>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

CARDILLO, C. et al. **Intravascular tumor necrosis factor α blockade reverses endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis**, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 30, n. 3, p. 275-281, 2006. Disponível em <<https://ascpt.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1016/j.clpt.2006.05.011>>. Acessado em: 14 de jul. de 2022.

CHATKIN, J. M. et al. **Óxido nítrico exalado no diagnóstico e acompanhamento das doenças respiratórias**. *Jornal de Pneumologia*, v. 26, n. 1, 2000. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/jpneu/a/KYdSdnqHBF5tXm865nj4FrB/?lang=pt#>>. Acessado em: 15 de nov. de 2022.

CHUAIPHICHA, S. et al. **Endothelial cell tetrahydrobiopterin deficiency attenuates LPS-induced vascular dysfunction and hypotension**. *Vascular Pharmacology*, v. 77, p. 69-79, 2016. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189115001950?via%3Dihub>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

CORTESE-KROTT, M. M. et al. **Zinc regulates iNOS-derived nitric oxide formation in endothelial cells**. *Redox Biology*, v. 16, n. 2, p. 945-954, 2014. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231714000834?via%3Dihub>>. Acessado em: 14 de jul. de 2022.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019. Disponível em <<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. **Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance**. *Circulation*, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007. Disponível em <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr pub%20%200pubmed>. Acessado em: 14 de nov. de 2022.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. K. **Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance**. *Circulation*, v. 115, n. 10, p. 1285-1295, 2007. Disponível em <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr pub%20%200pubmed>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

DINNON, K. H. et al. **A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures**. *Nature*, v. 586, p. 560-566, 2020. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2708-8>>. Acessado em: 02 de abr. de 2021.

DOLCI, M. et al. **In vitro sars-cov-2 infection of microvascular endothelial cells: effect on pro-inflammatory cytokine and chemokine release.** International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 7, 2022. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8999888/>>. Acessado em: 00 de jul. de 2022.

DOLMATOVA, E. V. et al. **The effects of sepsis on endothelium and clinical implications.** Cardiovascular Research. v. 117, n. 7, p. 60–73, 2021. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7810126/>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

DROSTEN, C. et al. **Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome.** The New England Journal of Medicine, v. 384, p. 1697-1976, 2003. Disponível em <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa030747?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 02 de ago. de 2022.

FARAH, C.; MICHAEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J. L. **Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease.** Nature Reviews Cardiology, v. 15, n. 5, p. 292-316, 2018. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/nrcardio.2017.224>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61 – 68, 1997. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/ramb/a/FBtqwzvvhJhcCgRbYZtp4yTQ/?format=pdf&lang=pt>>. Acessado em 26 de dez. de 2022.

FICHTLSCHERER, S. et al. **Tumor necrosis factor antagonism with etanercept improves systemic endothelial vasoreactivity in patients with advanced heart failure.** Circulation, v. 104, n. 25, p. 3023-3025, 2001. Disponível em <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/hc5001.101749?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

FINK, G. D. **Sympathetic activity, vascular capacitance, and long-term regulation of arterial pressure.** Hypertension, v. 53, n. 2, p. 307-312, 2008. Disponível em <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119990?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. **Endothelium-derived relaxing and contracting factors.** The FASEB Journal, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2545495/>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

GALLO, G.; MASSIMO Volpe, M.; SAVOIA, C. **Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications.** Frontiers in Medicine, v. 8, 2021. Disponível em <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.798958/full>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

GELMAN, S. **Venous Function and Central Venous Pressure**. Review Article, v. 108, n. 4, p. 735-748, 2008. Disponível em <<https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/108/4/735/8329/Venous-Function-and-Central-Venous-PressureA>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

GIORDO, R. et al. **SARS-CoV-2 and endothelial cell interaction in COVID-19: molecular perspectives**. Vascular Biology, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2021. Disponível em <<https://vb.bioscientifica.com/doi/10.1530/VB-20-0017>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

GUO, Y. et al. **Targeting TNF- α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies**. Frontiers in Public Health, v. 11, n. 10, 2022. Disponível em <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.833967/full>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

GUPTA, A. et al. **Extrapulmonary manifestations of COVID-19**. Natura Medicine, v. 26, p. 1017-1032, 2020. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0968-3>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

HANZU, F. A. et al. **Translational evidence of endothelial damage in obese individuals: inflammatory and prothrombotic responses**. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 9, n. 6, p. 1236-1245, 2011. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1538-7836.2011.04285.x>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

HARIHARAN, A. et al. **The Role and Therapeutic Potential of NF - kappa - B Pathway in Severe COVID - 19 Patients**. Inflammopharmacology, v. 29, n. 1, p. 91-100, 2021. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7648206/>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. **Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines**. Seminars in Immunology, v. 26, n. 3, p. 253-266, 2014. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532314000578?via%3Dihub>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

HOJYO, S. et al. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. Inflammation Regeneration, v. 40, n. 37, 2020. Disponível em <<https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-020-00146-3>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

HUANG, C. et al. **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China**. The Lancet, v. 395, p. 497-506, 2020. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/31986264/>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

HUERTAS, A. et al. **Endothelial cell dysfunction: A major player in SARS-CoV-2 infection (COVID-19)?**. European Respiratory journal, v. 56, 2020. Disponível em <<https://erj.ersjournals.com/content/56/1/2001634>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

JIA, F. et al. Role of tumor necrosis factor- α in the mortality of hospitalized patients with severe and critical COVID-19 pneumonia. Aging, v. 13, n. 21, p. 23895-23912, 2021. Disponível em <<https://www.aging-us.com/article/203663/text>>. Acessado em:

KONER, R. et al. **Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2.** Viruses, v. 12, n. 8, p. 880-906, 2020. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7471983/>>. Acessado em: 04 de nov. de 2022.

KORNER, R. W. et al. **Of Mice and Men: The Coronavirus MHV and Mouse Models as a Translational Approach to Understand SARS-CoV-2.** Viruses, v. 12, p. 880-906, 2020. Disponível em <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/8/880>>. Acessado em: 06 de abr. de 2021.

KRUGER-GENGE, A. et al. **Vascular endothelial cell biology: An update.** International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 8, 2019. Disponível em <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/18/4411>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

KSIAZEK t. G. et al. **A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.** New England Journal of Medicine, v. 15, n. 348, p. 1953-1966, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12690092/>>. Acessado em 07 de ago. 2022.

LAMBDEN, S. et al. **Definitions and pathophysiology of vasoplegic shock.** Critical Care, v. 22, n. 1, p. 423-429, 2018. Disponível em <<https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-018-2102-1>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

LI, Y. et al. **NADPH oxidase 2 inhibitors CPP11G and CPP11H attenuate endothelial cell inflammation & vessel dysfunction and restore mouse hind-limb flow.** Redox Biology, v. 22, 2019. Disponível em <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213-2317\(18\)31191-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213-2317(18)31191-1)>. Acessado em 13 de jul. de 2022.

LIANG, Y. et al. **Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells.** Shock, v. 41, n. 4, p. 275-281, 2014. Disponível em <https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2014/04000/Elevated_Levels_of_Plasma_TNF_Are_Associated.3.aspx>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

LIBBY, P., LUSCHER, T. **COVID-19 is, in the end, an endothelial disease.** European Heart Journal, v. 41, n. 32, 3038–3044, 2020. Disponível em <<https://academic.oup.com/eurheartj/article/41/32/3038/5901158>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

LIU, F. et al. **SARS-CoV-2 Infects Endothelial Cells In Vivo and In Vitro.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 6, n. 11, 2021. Disponível em <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.701278/full>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

LIU, T. et al. **NF- κ B signaling in inflammation,** Signal Transduction and Targeted Therapy, n. 17023, 2017. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/sigtrans201723>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

LONDON, G. M.; GUERIN, A. P. American Heart Journal, v. 138, p. 220-224, 1999. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10467216/>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

LOWRY, J. L. et al. **Endothelial Nitric-oxide Synthase Activation Generates an Inducible Nitric-oxide Synthase-like Output of Nitric Oxide in Inflamed Endothelium**. Journal of biological chemistry, v. 288, n. 6, p. 4174-4193, 2013. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820463744>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

LUTZ, Cathleen. et al. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. Human Genomics, v. 14, p. 1-11, 2020. Disponível em <<https://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-020-00272-6>>. Acessado em: 02 de abr. de 2022.

MAHESHWARI, K. et al. **The relationship between ICU hypotension and in-hospital mortality and morbidity in septic patients**. Intensive Care Med, v. 44, 6, p. 857-867, 2018. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-018-5218-5>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

MERIN, G. R. **A Função do Coração Efeitos das Drogas Anestésicas e Adjuvantes**. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 31, n. 6, p. 445-452, 1981. Disponível em <<https://www.bjan-sba.org/article/5f9c9dd48e6f1a40018b46f5/pdf/rba-31-6-445.pdf>> . Acessado em: 04 mai. de 2022.

METZ, A. et al. **Acute experimental venous thrombosis impairs venous relaxation but not contraction**. Journal of Vascular Surgery, v. 71, n. 3, p. 1006-1012, 2019. Disponível em <[https://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214\(19\)31123-1/fulltext](https://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214(19)31123-1/fulltext)>. Acessado em: 10 de jul. de 2022.

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, 2020. Disponível em <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(20\)30399-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420303998%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(20)30399-8?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867420303998%3Fshowall%3Dtrue)>. Acessado em: 03 de nov. de 2022.

MOREIRA, F. R. **Sobre as Leis de Poiseuille no sistema circulatório**. Vita et Sanitas, v. 2, n. 2, 2008. Disponível em <<http://fug.edu.br/revistas/index.php/VitaetSanitas/article/view/104>>. Acessado em: 01 de dez. de 2022.

NAGELE, M. P. et al. **Endothelial dysfunction in COVID-19 current findings and therapeutic implications**. Atherosclerosis, v. 314, p. 58-62, 2020. Disponível em <[https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(20\)30581-5/fulltext](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(20)30581-5/fulltext)>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

NÄGELE, M. P. et al. **Endothelial dysfunction in COVID-19: Current findings and therapeutic implications**. Atherosclerosis, v. 314, p. 58-62, 2020. Disponível em <[https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(20\)30581-5/fulltext](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(20)30581-5/fulltext)>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

OISETH, S.; JONES, L.; MAZA, E. **Resistências vascular, fluxo e pressão arterial média.** Lecturi, 2022. Disponível em <https://www.lecturio.com/pt/concepts/resistencia-vascular-fluxo-e-pressao-arterial-media/>. Acessado em: 01 de dez. de 2022.

PERICO L. et al. **Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19.** Nature Reviews Nephrology, v. 17, p. 46-64, 2021. Disponível em <https://www.nature.com/articles/s41581-020-00357-4>. Acessado em 28 de out. de 2022.

PICCHI, A. et al. **Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome.** Circulation Research, v. 99, n. 1, p. 96-77, 2006. Disponível em https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.0000229685.37402.80?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

QIAN, Y. et al. **Direct activation of endothelial cells by SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is blocked by Simvastatin.** BioRxiv, v. 95, n. 23, 2021. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7885915/pdf/nihpp-2021.02.14.431174.pdf>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

RĂZVAN-VALENTIN, S. et al. **Etanercept Prevents Endothelial Dysfunction in Cafeteria Diet-Fed Rats** **Etanercept Prevents Endothelial Dysfunction in Cafeteria Diet-Fed Rats.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 19, n. 4, 2022. Disponível em <https://www.mdpi.com/resolver?pii=ijerph19042138>. Acessado em: 14 de jul. de 2022.

RUHL, L. et al. **Endothelial dysfunction contributes to severe COVID-19 in combination with dysregulated lymphocyte responses and cytokine networks.** Signal Transduction and Targeted Therapy, v. 6, p. 1-15, 2021. Disponível em <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00819-6>. Acessado em: 14 de nov. de 2022.

SHE, J. et al. **2019 novel coronavirus of pneumonia in Wuhan, China: emerging attack and management strategies.** Clinical and Translational Medicine, v. 9, n. 19, p. 1-7, 2020. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033263/>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

SINGH, Ashutosh et al. **A Comprehensive Review of Animal Models for Coronaviruses: SARS-CoV2, SARS-CoV, and MERS-CoV.** Virologica Sinica, v. 35, p. 290-304, 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32607866/>. Acessado em: 03 de nov. de 2021.

TANSEY, E. A. et al. **Understanding basic vein physiology and venous blood pressure through simple physical assessments.** Advances in Physiology Education, v. 43, n. 3, p. 423-429, 2019. Disponível em https://journals.physiology.org/doi/10.1152/advan.00182.2018?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200pubmed. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

THOMAS, S. R.; CHEN, K.; KEANEY, J. F. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. **Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity**. *Antioxid Redox Signal*, v. 5, n. 2, p. 181-194, 2003. Disponível em <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/152308603764816541?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Acessado em: 14 de nov. de 2022.

TOTOSON, P. et al. **Etanercept improves endothelial function via pleiotropic effects in rat adjuvant-induced arthritis**, *Rheumatol. Rheumatology (Oxford)*, v. 55, n. 7, p. 1308-1317, 2016. Disponível em <<https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/kew062>>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

V'KOVSKI, P. et al. **Coronavirus biology and replication, implications for SARS-CoV-2**. *Natura Reviews Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 155-170, 2021. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-00468-6>>. Acessado em: 09 de jul. de 2022.

VANHOUTTE, P. M. et al. **Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update**. *Acta Physiologica*, v. 196, n. 2, 193-222, 2015. Disponível <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apha.12646>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

VARGA, Z. et al. **Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19**. *Lancet*, v. 365, n. 10234, p. 1417-1418, 2020. Disponível em <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30937-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30937-5/fulltext)>. Acessado em: 03 de nov. de 2022.

VOGES, I. et al. **Normal values of aortic dimensions, distensibility, and pulse wave velocity in children and young adults: a cross-sectional study**. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2012. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3514112/>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022

WHO [A]. **Timeline: WHO's COVID-19 responde**. World Health Organization, 2022. Disponível em <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>>. Acessado em 10 de ago. de 2022.

WHO. **Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. World Health Organization, 2022. Disponível em <<https://covid19.who.int/>>. Acessado em 10 de ago. de 2022.

WINKLER, E. S. et al. **SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function**. *Nature immunology*, v. 21, n. 11, p. 1327-1335, 2020. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/s41590-020-0778-2>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

WU, C. et al. **Risk factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China**. *Jama internal Medicine*, v. 180, n. 7, p. 934-943, 2020. Disponível em

<<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2763184>>.
Acessado em: 04 de nov. de 2022.

YANG, Z. et al. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. *Virologica Sinica*, v. 29, p. 393-402, 2014. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547683/>>. Acessado em: 02 de abr. de 2021.

ZAKI, A. M. et al. **Isolation os a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia.** *The New England Journal of Medicine*, v. 367, p. 1814-1820, 2012. Disponível em <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1211721>>. Acessado em: 02 de ago. de 2022.

ZENG, M. et al. **Tumor necrosis factor- α -induced leukocyte adhesion and microvessel permeability.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory and physiology*, v. 283, n. 6, p. 2420-2430, 2002. Disponível em <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.00787.2001?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org>. Acessado em: 13 de jul. de 2022.

ZHANG, H. et al. **Role of TNF- α in vascular dysfunction.** *Clinical Science*, v. 116, p. 219-230, 2009. Disponível em <<https://portlandpress.com/clinsci/article/116/3/219/68666/Role-of-TNF-in-vascular-dysfunction>>. Acessado em: 11 de jul. de 2022.

ZHONG, N.S. et al. **Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003.** *The Lancet*, v. 362, n. 9393, p. 1353-1358, 2003. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603146302>>. Acessado em: 02 de ago. 2022.

ZHOU, F. et al. **Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study.** *The lancet*, v. 395, p. 1054-1062, 2020. Disponível em <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30566-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30566-3/fulltext)>. Acessado em: 04 de nov. de 2022.