



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

JULIANE STEPHANIE MENDONÇA RODRIGUES

**ANGIOTENSINA II MODULA A RESPOSTA INDUZIDA PELA
PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NA EXPRESSÃO DE
ECA2, AT1R E MASR E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CÉLULAS MUSCULARES LISAS BRÔNQUICAS HUMANAS.**

**Araçatuba - SP
2025**



JULIANE STEPHANIE MENDONÇA RODRIGUES

**ANGIOTENSINA II MODULA A RESPOSTA INDUZIDA PELA
PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NA EXPRESSÃO DE
ECA2, AT1R E MASR E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CÉLULAS MUSCULARES LISAS BRÔNQUICAS HUMANAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciências Fisiológicas

Orientadora: Prof. Dr. Sandra Helena Penha de Oliveira

Araçatuba - SP

2025

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Rodrigues, Juliane Stephanie Mendonça.
R696p Angiotensina II modula a resposta induzida pela
proteína Spike do SARS-CoV-2 na expressão de ECA2, AT1R e
MASR e a resposta inflamatória em células musculares lisas
brônquicas humanas / Juliane Stephanie Mendonça Rodrigues. -
Araçatuba, 2025
86 f. : il. ; tab., graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Sistema renina-angiotensina 2. SARS-CoV-2
3. Angiotensina II 4. Inflamação 5. Citocinas I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho a todos que fizeram
parte dessa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, nas pessoas de sua direção por oferecer a oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), nas pessoas de sua coordenação geral, Professora Dra. Rita Cassia Menegati Dornelles (FOA-UNESP) e presidente da SBFis, Professora Titular Ilma Simoni Brum da Silva (UFRGS).

Agradeço a Deus, pela saúde, força e sabedoria concedidas ao longo de todo esse percurso.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira pela confiança, orientação firme e rigorosa, pela paciência, pelo incentivo constante e pelas valiosas contribuições científicas e humanas. Sua dedicação e comprometimento foram fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos membros do grupo de pesquisa do laboratório "Limfa", em especial ao meu amigo de mestrado Lucas Henrique Custódio e minha amiga e aluna de iniciação científica Beatriz Travalon, agradeço pela convivência, apoio técnico e científico, pelas discussões produtivas e pela colaboração durante as diversas etapas da pesquisa. Além do tempo de qualidade fora da universidade.

Aos professores do programa de pós-graduação multicêntrico em ciências fisiológicas do departamento de ciências básicas desta instituição, pelas contribuições acadêmicas e científicas que enriqueceram minha formação, pelos reagentes e materiais eventualmente emprestados/cedidos para realização dos ensaios desta pesquisa, além do carinho e cuidado não apenas comigo, mas com todos os alunos.

A todos meus colegas e amigos de jornada dos demais laboratórios do departamento de ciências básicas desta instituição, em especial a Mariana Santana Quirino do laboratório de farmacologia cardiovascular, as meninas do laboratório LaFEE, as meninas do laboratório LAEM e ao pessoal do laboratório LaBiqS pela amizade, risadas, momentos de confraternização compartilhados, apoio mútuo, troca de experiências, contribuições científicas e palavras de encorajamento nos momentos difíceis.

Aos ensinamentos do meu pai, Carlos Alexandre Rodrigues concedidos a mim quando em vida e a minha mãe Luzia Carolina Mendonça, por todo amor, ajuda e apoio durante esse período. A minha irmã, Gabriella Mendonça Rodrigues por sempre me apoiar e me motivar e aos demais familiares, por acreditarem em mim e me motivarem a seguir em frente.

Ao meu namorado e companheiro Geovani Costa Gomes, pelo amor demonstrado a mim, por sempre me acompanhar nos finais de semanas ao departamento, me encorajando e apoiando com gestos gentis e palavras de carinho.

A todos os funcionários e servidores presentes de alguma forma no departamento por todo amparo e suporte necessário para o bom funcionamento dos equipamentos e ambientes.

Por fim, agradeço às instituições de fomento e apoio à pesquisa, em especial à CNPq, pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa de mestrado que viabilizou a realização deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do Processo nº. 2020/10711-5

A realização deste trabalho e a conclusão do mestrado representam não apenas um marco acadêmico, mas também pessoal. Por isso, sou profundamente grata a todos que, de alguma forma, contribuíram para essa jornada. A todos, o meu mais sincero agradecimento.

"Na mais profunda crise, revelam-se as engrenagens invisíveis da ciência — e são nelas que encontramos as respostas para reconstruir."

RESUMO

RODRIGUES, J. S. M. **ANGIOTENSINA II MODULA A RESPOSTA INDUZIDA PELA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 NA EXPRESSÃO DE ECA2, AT1R E MASR E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS BRÔNQUICAS HUMANAS.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

O SARS-CoV-2 utiliza sua proteína Spike (Sp) para se ligar à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), facilitando a entrada viral nas células e desencadeando respostas inflamatórias nas vias aéreas. A ECA2 integra o sistema renina-angiotensina (SRA), que regula o equilíbrio entre as vias pró-inflamatória (ACE/Ang II/AT1R) e anti-inflamatória (ECA2/Ang-(1-7)/MASR). As células musculares lisas brônquicas (BSMCs) desempenham papel fundamental tanto na homeostase quanto na inflamação das vias aéreas. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos dos antagonistas do receptor AT1, losartana (LOS), e do receptor MAS, A-779, sobre a expressão de componentes do SRA e sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8 em BSMCs expostas à proteína Sp ou à Ang II, e se a Ang II regula as respostas induzidas pela proteína Sp. As células foram submetidas a um protocolo experimental com diferentes concentrações de Sp (50, 100 ou 500 ng/mL) e Ang II (100 ng/mL), incluindo também grupos sensibilizados com Ang II por uma hora antes da estimulação com Sp. As análises foram realizadas após 3, 12 e 24 hs de estimulação. Para avaliar os efeitos moduladores dos receptores, realizou-se pré-tratamento com LOS e A-779 por 1h ou 2 hs antes da exposição a Sp e Ang II. Foram avaliadas a expressão gênica de ECA2, AT1R, MASR, IL-1 β e IL-8 por RT-qPCR; os níveis proteicos de IL-1 β e IL-8 por ELISA; a expressão proteica de ECA2 por imunofluorescência; e a viabilidade celular por ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que tanto Sp quanto Ang II aumentaram a expressão de AT1R e MASR. O tratamento com LOS e A-779 evidenciou que a expressão desses componentes é mediada pelos receptores AT1R e MASR, sendo que a pré-sensibilização com Ang II modulou negativamente a indução desses receptores pela Sp. A expressão de ECA2 foi estimulada independentemente da ativação dos receptores, porém o bloqueio de MASR com A-779 potencializou esse efeito. Os níveis de proteína ECA2 foram aumentados pela Sp, possivelmente por via dependente do AT1R, enquanto Ang II influenciou a secreção da ECA2. Sp e Ang II, induziram a expressão e secreção de IL-1 β e IL-8 nas BSMCs, com efeitos da Ang II mais evidentes após 12h. A LOS inibiu a produção das citocinas induzida por Sp, destacando o papel inflamatório da via Ang II/AT1R. Já o bloqueio de MASR com A-779 aumentou as citocinas nas primeiras horas, confirmando seu papel protetor. A pré-sensibilização com Ang II reduziu IL-1 β e IL-8, modulando as respostas da Sp de forma tempo-dependente. Esses achados reforçam a participação ativa da via SRA na inflamação induzida por SARS-CoV-2 nas BSMCs das vias aéreas.

Palavras-chave: proteína Spike; sistema renina-angiotensina; SARS-CoV-2; angiotensina II; inflamação; células musculares lisas brônquicas.

ABSTRACT

RODRIGUES, J. S. M. **ANGIOTENSIN II MODULATES THE SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN-INDUCED RESPONSE ON ACE2, AT1R, AND MASR EXPRESSION AND THE INFLAMMATORY RESPONSE IN HUMAN BRONCHIAL SMOOTH MUSCLE CELLS.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

SARS-CoV-2 utilizes its Spike protein (Sp) to bind to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), facilitating viral entry into host cells and triggering inflammatory responses in the airways. ACE2 is a key component of the renin-angiotensin system (RAS), which regulates the balance between the pro-inflammatory (ACE/Ang II/AT1R) and anti-inflammatory (ACE2/Ang-(1–7)/MASR) pathways. Bronchial smooth muscle cells (BSMCs) play a crucial role in both airway homeostasis and inflammation. This study aimed to investigate the effects of antagonists of the AT1 receptor, losartan (LOS), and the MAS receptor, A-779, on the expression of RAS components and on the production of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8 in BSMCs exposed to Sp or angiotensin II (Ang II). Cells were subjected to an experimental protocol involving different concentrations of Sp (50, 100, or 500 ng/mL) and Ang II (100 ng/mL), including groups pre-sensitized with Ang II one hour prior to Sp stimulation. Analyses were performed at 3, 12, and 24 hours post-stimulation. To assess the modulatory effects of receptor antagonism, pre-treatment with LOS and A-779 was conducted for 1 and 2 hours before stimulation with Sp and Ang II. Gene expression of ACE2, AT1R, MASR, IL-1 β , and IL-8 was evaluated by RT-qPCR; protein levels of IL-1 β and IL-8 were measured by ELISA; ACE2 protein expression was analyzed via immunofluorescence; and cell viability was assessed using the MTT assay. The results showed that both Sp and Ang II increased the expression of AT1R and MASR. Treatment with LOS and A-779 demonstrated that the expression of these components is mediated by their respective receptors, with Ang II pre-sensitization negatively modulating the Sp-induced receptor expression. ACE2 expression was upregulated independently of receptor activation; however, MASR blockade with A-779 further enhanced this effect. ACE2 protein levels were increased by Sp, possibly through an AT1R-dependent mechanism, while Ang II modulated ACE2 secretion. Both Sp and Ang II induced the expression and secretion of IL-1 β and IL-8 in BSMCs, with Ang II effects being more pronounced at 12 hours. LOS inhibited the Sp-induced production of cytokines, highlighting the pro-inflammatory role of the Ang II/AT1R pathway. In contrast, MASR blockade with A-779 elevated cytokine levels at early time points, confirming its protective role. Pre-sensitization with Ang II reduced IL-1 β and IL-8 levels, modulating the effects of Sp in a time-dependent manner. These findings underscore the active participation of the RAS pathway in SARS-CoV-2-induced inflammation in the airways.

Keywords: Spike protein; renin-angiotensin system; SARS-CoV-2; angiotensin II; inflammation, bronchial smooth muscle cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2 e seus principais componentes.	19
Figura 2 – Representação esquemática do SRA em condições fisiológicas e durante a infecção pelo SARS-CoV-2.	22
Figura 3 – Esquema representativo do protocolo estabelecido para estimulação das BSMCs com Sp e Ang II.	32
Figura 4 – Esquema representativo do protocolo estabelecido para o pré-tratamento nas BSMCs com os antagonistas dos receptores AT1 (LOS) e MAS (A-779).	33
Figura 5 – Morfologia das BSMCs sob microscopia montada em câmera invertida e coloração por H&E.	40
Figura 6 – Ensaio de MTT para viabilidade celular e toxicidade das BSMCs expostas a diferentes [] de Sp e a Ang II.	41
Figura 7 – Expressão do mRNA do receptor AT1R nas BSMCs estimuladas por diferentes concentrações de Sp e por Ang II.	43
Figura 8 – Expressão do mRNA de ECA2 nas BSMCs estimuladas por diferentes concentrações de Sp e por Ang II.	44
Figura 9 – Expressão do mRNA do receptor MAS nas BSMC estimuladas por diferentes concentrações de Sp e por Ang II.	46
Figura 10 – Expressão gênica dos componentes do SRA (AT1R, ECA2 e MASR) nas BSMC com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II.	49
Figura 11 – Intensidade média de fluorescência de ECA2 (IF) das BSMC com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II 1h antes do estímulo com Sp.	51
Figura 12 – Expressão do mRNA de IL-1 β e IL-8 nas BSMC estimuladas por diferentes concentrações de Sp e por Ang II.	53
Figura 13 – Expressão gênica das citocinas inflamatória IL-1 β e IL-8 nas BSMC com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II.	56
Figura 14 – Dosagem de produção e liberação IL-1 β e IL-8 com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II por ELISA.	58

Figura 15 – Representação esquemática dos mecanismos de sinalização mediados pela Sp do SARS-CoV-2 e pela Ang II em BSMC sugeridos no presente trabalho, bem como os efeitos dos antagonistas LOS e A-779 nos componentes do SRA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados	35
Tabela 2 – Relação dos Kits DuoSet utilizados (R&D systems)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+ssRNA	RNA de cadeia simples e senso positivo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A-779	Sal de trifluoroacetato A-779
Ang I	Angiotensina 1
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang II	Angiotensina 2
ANOVA	Analysis of variance, análise de variância
ASB	Albumina sérica bovino
AT1R	Receptor de Angiotensina do tipo 1
AT2R	Receptor de Angiotensina do tipo 2
BSMC	Human Bronchial Smooth Muscle Cells
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
Ct	Cycle threshold, Ciclo limiar
CXCL-8/IL-8	Interleucina 8 / interleukin 8
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DEPC	Diethyl pyrocarbonate, Pirocarbonato de dietila
D-MEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Deoxyribonucleic acid, Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
E	Envelope
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	ácido hidroxietil piperazineetanesulfônico
IL-1β	Interleucina 1 beta / interleukin 1 beta
LOS	Losartana
M	Membrana
MASR	Receptor MAS

MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro / RNA mensageiro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
N	Nucleocapsídeo
NAA	Aminoácidos não essenciais
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
RCF	Campo Centrífugo Relativo
RNA	Ribonucleic acid, Ácido ribonucleico
RPM	Velocidade Máxima Desejada
RQ	Quantificação Relativa
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
S	Spike
S1	Subunidade de ligação ao receptor S1 da Spike
S2	Subunidade de fusão de membrana S2 da Spike
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2
SD	Desvio padrão da média
SFB	Soro Fetal Bovino
Sp	Proteína Spike / Spike protein
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TaqMan	Enzima Taq DNA polimerase
TMB	Tetrametil-benzidina
PBS	Phosphate-buffered saline, Tampão fosfato salino

LISTA DE SÍMBOLOS

*	Asterisco
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
#	Hashtag
+	Mais
$\pm$	Mais ou menos
®	Marca registrada
<	Menor que
-	Menos
n	Numéro
%	Porcentagem / Por cento
™	Trademark; Marca comercial
Δ	Variação
$\Delta\Delta$	Variação da variação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBEJTIVOS	29
2.1 Objetivos Gerais	29
2.2 Objetivos Especificos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Cultura celular da musculatura lisa brônquica humana (BSMC)	31
3.2 Estimulação das BSMC com proteína S recombinante do SARS-CoV-2	31
3.3 Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade dos estímulos	32
3.4 Tratamento das BSMCs com os antagonistas dos receptores do SRA	33
3.5 Análise da expressão gênica dos componentes do SRA e das citocinas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	34
3.5.1 Coleta das amostras	34
3.5.2 Extração e quantificação do RNA total	34
3.5.3 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia de polimerase em tempo real	35
3.5.4 Análises dos dados de expressão gênica	36
3.6 Ensaio ELISA sandwich (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	36
3.7 Imunocitoquímica de fluorescência ICC/IF	37
3.8 Analises estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Características morfológicas das BSMC em cultura	40
4.2 A concentração de proteína Spike não afetou a viabilidade celular das BSMC	41
4.3 A proteína S do SARS-CoV-2 aumenta a expressão gênica do receptor AT1, da ECA2 e do receptor MAS e a Ang II modula essa expressão	41
4.4 Antagonistas dos receptores do AT1 e MAS diminuem a expressão gênica do receptor AT1 e MAS em BSMC estimuladas à proteína S do SARS-CoV-2 e/ou Ang II	46

4.5 Ativação das vias AT1R e MASR modulam a expressão proteica de ECA2 mediada pela proteína Spike e pela sensibilização por Ang II seguida de Sp nas BSMCs	50
4.6 A proteína Spike do SARS-CoV-2 aumenta a expressão de IL-1 β e IL-8 em BSMCs	51
4.7 O bloqueio do receptor MAR potencializa a expressão gênica de IL-1 β e IL-8 induzida pela Sp e Ang II	53
4.8 A proteína Spike recombinante do SARS-CoV-2 aumenta a produção proteica de IL-1 β e IL-8	56
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) compreendem uma grande família de vírus capazes de desenvolver infecções respiratórias em animais e humanos, incluindo a síndrome respiratória do oriente médio (MERS) e a síndrome respiratória aguda grave (SARS)¹. Em dezembro de 2019, um novo coronavírus pertencente à família *Coronaviridae* surgiu na cidade de Wuhan, na China, apresentando sintomas clínicos semelhantes à pneumonia viral. Análises profundas de sequenciamento de amostras do trato respiratório inferior foram avaliados e um novo coronavírus foi confirmado². O novo vírus apresenta grandes semelhanças com as infecções respiratórias causadas pelos coronavírus SARS e MERS-CoV, os quais compartilham características evolutivas relacionadas à transmissão interespecíes. O SARS, identificado em 2002, caracterizou-se por uma cadeia de transmissão que aparentemente saltou de morcegos para pangolins e, subsequentemente, para seres humanos. Da mesma forma, em 2012, a transmissão do MERS-CoV saltou de morcegos para camelos e, posteriormente, para a seres humanos. Tais evidências sugerem que o SARS-CoV-2 possa compartilhar padrões semelhantes de transmissibilidade e origem evolutiva com esses coronavírus previamente identificados³. Esse vírus foi denominado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), devido sua semelhança genética com o SARS-CoV⁴.

Assim como outros CoVs, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com o maior genoma de RNA, que varia de 26 a 32 Kb. O seu RNA de fita simples positiva (+ssRNA) possui duas regiões não traduzidas (UTRs do inglês untranslated region) e uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês open reading frame) que codifica 4 principais proteínas estruturais: a espícula spike (S), envelope (E), proteína de membrana (M) e nucleocapsídeo (N), necessárias para a formação da partícula viral (figura 1)^{5,6}; e 2 poliproteínas precursoras (pp1a e pp1ab) que são processadas em 16 proteínas não estruturais (nsP1-16) que desempenham um importante papel na replicação e transcrição do RNA viral^{7,8}.

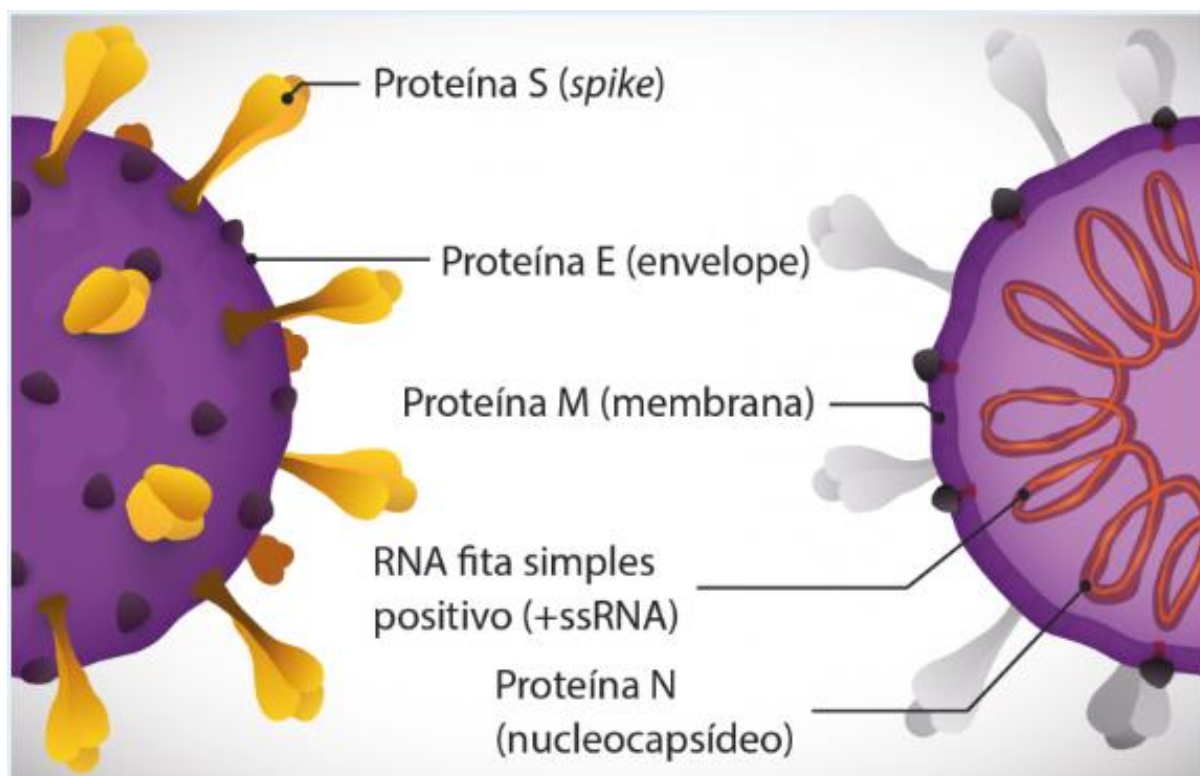


Figura 1 – Esquema representativo da estrutura do vírus SARS-CoV-2 e seus principais componentes estruturais. O vírus é composto por um envelope lipídico que contém três proteínas estruturais: proteína S (spike), responsável pela ligação ao receptor ECA2 nas células hospedeiras; proteína M (membrana), que proporciona forma ao vírus; e proteína E (envelope), envolvida na montagem e liberação viral. No interior do vírus, encontra-se o RNA viral de fita simples positiva (+ssRNA), associado à proteína N (nucleocapsídeo), que participa da proteção e organização do material genético viral. Essas estruturas desempenham papel fundamental na infectividade e patogenicidade do vírus.

O SARS-CoV-2 é o agente causador da COVID-19, uma doença infecciosa caracterizada principalmente pelo desenvolvimento de infecções respiratórias graves como a SARS. A COVID-19 espalhou-se rapidamente pelo mundo devido sua alta taxa de transmissibilidade por gotículas de saliva dispersas no ar ou contato com superfícies contaminadas, afetando um número crescente de países. Em fevereiro de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de pandemia do novo coronavírus⁹. A COVID-19 manifesta-se de maneira assintomática na maioria da população. Entretanto, em pacientes sintomáticos as características clínicas da doença podem incluir febre, tosse não produtiva, dispneia, mialgia, fadiga, dor de cabeça, contagem de leucócitos diminuída ou normal e evidência radiográfica de pneumonia, os quais são sintomas similares ao SARS-CoV e MERS-CoV, podendo levar ao óbito em quadros mais graves⁴. Dados tem demonstrado que a SARS é a principal causa de morte por COVID-19¹⁰. Em agosto de 2022, havia aproximadamente 580 milhões de casos confirmados de COVID-19 e

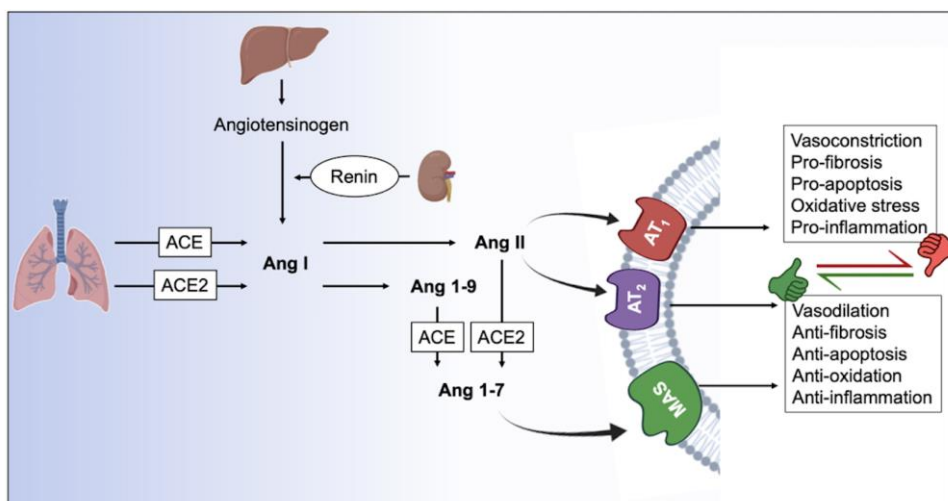
aproximadamente 6,4 milhões de mortes confirmadas devido a esta doença. Os dados são suficientes para destacar a gravidade da infecção por SARS-CoV-2¹¹. Atualmente, de acordo com os dados disponibilizado pela OMS de maio de 2025, os números de infectados e mortes se mostram mais controlados, possivelmente devido a vacinação e cuidados tomados anteriormente¹².

O SARS-CoV-2 usa as vias aéreas do sistema respiratório como principal porta de entrada no organismo hospedeiro, promovendo a liberação de uma “tempestade” de citocinas, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica descontrolada. Isso leva à liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TGF- α , e quimiocinas como IL-8, CXCL-9 e CXCL-10 por macrófagos ativos presentes durante a infecção por SARS-CoV-2 (3,4).

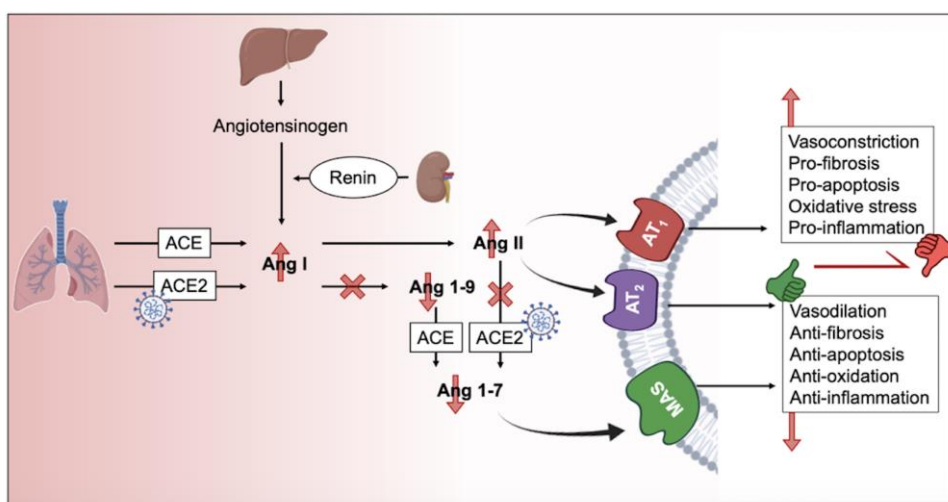
Os coronavírus tem como característica infectar células hospedeiras que expressam a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). A ECA2 foi anteriormente reconhecida como o receptor funcional para SARS-CoV (5). No entanto, no início da pandemia do COVID-19, estudos conduzidos anteriormente também confirmaram ECA2 como o principal receptor para SARS-CoV-2^{13,14}.

A proteína Spike (Sp) do SARS-CoV-2 é a responsável por mediar a interação do vírus com a célula hospedeira, possibilitando a fusão entre a membrana viral e a membrana celular por meio da sua ligação com a ECA2^{13,15}. A proteína S consiste em uma subunidade de ligação ao receptor S1 e uma subunidade de fusão de membrana S2. Estudos de microscopia eletrônica revelaram seu formato, sendo o pico um trímero em forma de cravo com três cabeças S1 e um pedúnculo S2 trimérico^{16,17}. Durante a entrada do vírus, S1 se liga a um receptor na superfície da célula hospedeira, a ECA2, para fixação viral, assim, após essa ligação, a subunidade S2 é ativada pela ação da protease transmembrana serina 2, clivando-a, iniciando a formação do poro de fusão, o que leva a fusão as membranas hospedeira e viral, permitindo a entrada dos genomas virais nas células infectadas¹⁸. A ligação do receptor e a fusão da membrana são as etapas iniciais e críticas no ciclo de infecção do coronavírus e consequentemente da liberação de citocinas e do desenvolvimento de SARS na COVID-19¹⁹. Entretanto, estudos que ao comparar a interação da proteína S com a ECA2, verificou-se que a Sp do SARS-CoV-2 possui 10 a 20 vezes mais afinidade com a ECA2 em comparação ao SARS-CoV, o que explica a maior taxa de infecção e transmissibilidade da COVID-19²⁰.

A ECA2 é um importante componente do sistema renina-angiotensina (SRA). Este sistema desempenha um papel crucial na regulação do equilíbrio eletrolítico e da pressão arterial, além disso, tem sido descrito o envolvimento do SRA no processo inflamatório e via angiotensina II (Ang II) ²¹. A síntese de Ang II inicia com a produção de angiotensinogênio pelo fígado que é liberado na corrente sanguínea. A renina secretada pelas células epitelióides da parede interna das artérias glomerulares cliva o angiotensinogênio em um decapeptídeo denominado angiotensina I (Ang I). Ang I sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) formando um octapeptídeo vasoativo Ang II. Após sua produção, a Ang II exerce efeitos biológicos ativando os receptores de Ang II do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2) ligados a proteína G. Os efeitos vasoconstritores, pró-inflamatórios, pró-proliferativos e fibrogênicos conhecidos da Ang II ocorre ao ativar o AT1R. No entanto, ao se ligar ao receptor de AT2, a Ang II promove efeitos protetores, como vasodilatação, antiapoptose, antifibrose, antioxidantes e anti-inflamatórios. ^{22,23}. Além disso, a Ang II pode ser clivada pela ação da ECA2, uma isoenzima da ECA, formando um heptapeptídeo angiotensina (1-7) (Ang 1-7), que interage com o receptor MAS ligado a proteína G_{ai}, exercendo efeitos anti-inflamatório e anti-remodelador, contrários aos da Ang II, semelhantes aos mediados pelo AT2R (Figura 2) (9,10). Consequentemente, o SRA tem dois eixos: (1) o eixo pró-inflamatório ECA/Ang II/AT1R e (2) o eixo anti-inflamatório ECA2/Ang-(1-7)/MASR. O receptor ECA2 desempenha um papel importante no equilíbrio entre os dois eixos, assegurando a homeostase do SRA²³⁻²⁶. Esses componentes podem se tornar um novo alvo para o tratamento de processos inflamatórios, como aqueles desenvolvidos pelo vírus SARS-CoV-2^{26,27}.



A. Sistema renina-angiotensina em equilíbrio



B. Sistema renina-angiotensina em desequilíbrio na presença do SARS-CoV-2

Figura 2. Representação esquemática do SRA em condições fisiológicas e durante a infecção pelo SARS-CoV-2. (A) Em condições de equilíbrio, a Ang II, formada pela ação da ECA, atua principalmente por meio do receptor AT₁R, promovendo efeitos como vasoconstrição, fibrose, apoptose, estresse oxidativo e inflamação. Paralelamente, a ECA₂ converte Ang II em Ang 1-7, que se liga ao receptor MAS, mediando efeitos protetores como vasodilatação, ação anti-inflamatória, anti-apoptótica e antioxidante, mantendo o equilíbrio do SRA. (B) Na presença do SARS-CoV-2, ocorre ligação da Sp à ECA₂, levando à sua internalização e redução da função na membrana celular. Esse evento diminui a conversão de Ang II em Ang 1-7, favorecendo a ativação exacerbada do eixo ECA/Ang II/AT₁R e a consequente intensificação dos efeitos deletérios, como inflamação, estresse oxidativo e fibrose, contribuindo para a gravidade da COVID-19.

O SRA desempenha um papel crítico na regulação da função inflamatória, e sua disfunção em resposta à infecção viral pode contribuir para a super expressão do sistema imunológico e prejudicar condições respiratórias, como inflamação pulmonar e causar broncoconstrição pela ativação das células da musculatura lisa brônquica. A alteração na produção de citocinas, mediadores fundamentais da resposta inflamatória, também pode levar ao agravamento desses sintomas respiratórios e à

progressão da doença^{27,28}. É amplamente reconhecido que a Ang II exerce seus efeitos predominantemente por meio da ligação aos receptores AT1. Essa interação desencadeia uma complexa cascata de sinalização intracelular, envolvendo a ativação de vias como MAPK, JNK e NF- κ B. A ativação dessas vias resulta na expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6 e IL-1 β e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), além de quimiocinas, como IL-8/CXCL8, CCL2 e CXCL10, e moléculas de adesão celular, favorecendo o recrutamento e a migração de leucócitos para os tecidos inflamados²⁹. Além disso, a interação da Ang II com AT1R estimula a produção de espécies reativas de oxigênio por meio da ativação da NADPH oxidase, o que contribui significativamente para o dano celular e para a amplificação da resposta inflamatória. Está bem descrito que Ang II apresenta importantes funções na modulação imunológica, influenciando a resposta imune adaptativa ao promover a ativação de células T e a secreção de citocinas inflamatórias, mecanismos que estão implicados no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas^{30,31}.

A regulação positiva do braço clássico do SRA pode ser parcialmente responsável pelos mecanismos fisiopatológicos deletérios da COVID-19, adicionados pela ativação viral da resposta imune inata e adaptativa^{32,33}. No cenário da COVID-19, Ang II tem um importante papel na promoção da inflamação causada pelo vírus. Uma vez que, a Sp do SARS-CoV-2 se liga à ECA2, responsável por degradar Ang II em Ang 1-7. Sem a funcionalidade da ECA2 disponível, favorece o eixo pró-inflamatório ECA/Ang II/AT1R, devido a hiperativação do AT1R pelo excesso de Ang II, levando à síndrome da tempestade de citocinas e consequente dano celular. A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IFN- γ , desempenha um papel central na progressão das manifestações clínicas graves associadas à infecção pelo SARS-CoV-2³⁴. Esse aumento persistente de citocinas no plasma intensifica a inflamação sistêmica, contribuindo para o desenvolvimento de inflamação pulmonar, dano tecidual significativo, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), falência de múltiplos órgãos e, em casos extremos, óbito^{4,35,36}.

A pandemia causada pelo SARS-CoV-2, evidenciou ainda mais o papel central do SRA na fisiopatologia da infecção. Neste contexto, a modulação farmacológica dos componentes do SRA tem sido investigada como estratégia terapêutica em pacientes com COVID-19. A losartana, um antagonista seletivo do receptor AT1, inibe a ligação

da Ang II, bloqueando os efeitos deletérios mediados por esse receptor. Por outro lado, o A-779, um peptídeo antagonista experimental do receptor MAS, tem sido utilizado em modelos experimentais para estudar a função da via alternativa do SRA. Acredita-se que o desequilíbrio entre esses dois eixos contribua para a tempestade de citocinas e para os danos teciduais observados nos casos graves de COVID-19. Dessa forma, o uso de bloqueadores como a losartana tem sido proposto para atenuar os efeitos inflamatórios exacerbados, restaurar a homeostase do SRA e, potencialmente, reduzir a lesão pulmonar responsável pela gravidade da doença ³⁷. Embora o A-779 ainda não seja utilizado clinicamente, sua aplicação experimental tem fornecido importantes evidências sobre o papel anti-inflamatório da ativação do receptor MAS^{38–40}. Compreender o funcionamento das vias do SRA e os efeitos dos antagonistas de AT1R, losartana e MASR, A-779 sobre a ação da proteína Spike do SARS-CoV-2 e da Ang II é necessário para orientar o desenvolvimento de intervenções mais eficazes contra os efeitos inflamatórios graves da COVID-19.

A infecção por SARS-CoV-2 afeta principalmente o sistema respiratório humano, devido sua facilidade de entrar no organismo pelo ar. O vírus interage com células presentes nos tubos respiratórios, como por exemplo, células epiteliais e endoteliais brônquicas, entretanto, o brônquio é formado por outros tipos celulares que podem ter efeitos diretos ou indiretos sobre a infecção viral, incluindo as células do músculo liso brônquico (BSMC). As BSMCs são consideradas um elemento chave do sistema respiratório, elas desempenham um papel multifacetado na fisiologia e patologia das vias aéreas humanas, sendo responsável pela contração brônquica hiperresponsividade (resposta exagerada das vias aéreas a uma série de estímulos) e remodelação das vias aéreas^{41,42}. Elas são capazes de promover proliferação, migração e contração. Além disso, as BSMCs desempenham papel ativo na modulação da inflamação, uma vez que são capazes de produzir diversas citocinas, quimiocinas, componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, atuando como importantes imunomoduladores no ambiente inflamatório⁴³. A função dessas células é regulada de maneira fenotípica, permitindo que elas transitem reversivelmente entre os fenótipos contrátil e sintético, de acordo com os estímulos recebidos^{44,45}. A secreção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, pelas BSMCs contribui para a manutenção da inflamação crônica nas vias aéreas⁴⁶. Em condição inflamatória, essas células geram diferentes tipos de mediadores, tais como interferon γ , interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12, quimiocinas

CXCL10, IL-8 e CCL2, influenciando desde a contração muscular até a inflamação e remodelação tecidual. Eventualmente, elevados níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias têm sido associados à intensificação da inflamação e ao extenso comprometimento pulmonar em pacientes acometidos pela síndrome respiratória aguda grave (SARS)^{36,47}. No contexto da infecção pelo SARS-CoV-2, foi relatado um aumento significativo nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias associadas aos perfis Th1 e Th2, resultando em uma tempestade de citocinas, que caracteriza um dos principais fatores responsáveis pela progressão para quadros clínicos graves da COVID-19. Altos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 e TGF β) e quimiocinas (CCL2, CXCL10, CXCL9 e IL-8) foram encontrados em pacientes com SARS com situação grave em comparação com indivíduos com SARS não complicada^{36,45,47}. Essa associação foi evidenciada pela observação de pacientes com COVID-19 internados em UTIs, que apresentaram concentrações plasmáticas significativamente mais elevadas de IL-1 β , CCL2 e TNF- α , em comparação àqueles que não necessitaram de internação intensiva^{35,48}. Compreender os mecanismos de infecção e as respostas inflamatórias desse tipo celular é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para o combate a doenças respiratórias, como aquelas projetadas para a COVID-19^{49,10}.

A interleucina-1 beta (IL-1 β) é uma citocina pró inflamatórias central na mediação de processos inflamatórios³⁵. Produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células epiteliais em resposta a estímulos patogênicos, a IL-1 β é ativada por meio do inflamassoma NLRP3, o qual converte a pró-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa por ação da caspase-1. Uma vez secretada, a IL-1 β induz febre, recruta leucócitos para o local da infecção, promove a produção de outras citocinas inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) e aumenta a expressão de moléculas de adesão endotelial, contribuindo para o estabelecimento da inflamação local e sistêmica^{50–52}. Estudos informam que tanto IL-18 quanto IL-1 β são citocinas pró inflamatórias pleiotrópicas que desempenham papéis cruciais nas respostas imunes inatas, além de contribuir na construção das respostas imunes adaptativas^{53,54}. No entanto, a expressão exagerada dessas citocinas pode causar dano tecidual, e esse aumento está envolvido na patogênese de pneumonia grave, sepse e choque^{48,53}. A IL-1 β é a citocina mais envolvida em uma variedade de atividades celulares, como proliferação celular, síntese de imunoglobulinas e ativação de células T, que modulam o resultado da infecção por vírus^{55,56}. No contexto da infecção pelo SARS-CoV-2, a IL-1 β

desempenha papel relevante na fisiopatologia da COVID-19. Estudos mostram que pacientes com quadros moderados a graves apresentam níveis elevados de IL-1 β no plasma e no lavado broncoalveolar, associando-se à tempestade de citocinas, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e pior prognóstico clínico^{57,58}. A ativação exacerbada da via do inflamassoma em células pulmonares e imunológicas, em resposta à presença viral e ao dano tecidual, leva ao aumento expressivo de IL-1 β , contribuindo para a inflamação alveolar, edema pulmonar e falência respiratória⁵⁰. Com isso, a IL-1 β tem sido considerada um marcador para quadros graves da COVID-19. No entanto, ainda há necessidade de elucidar os mecanismos celulares específicos que controlam a expressão e a secreção de IL-1 β em células das vias aéreas, especialmente naquelas que expressam receptores do sistema renina-angiotensina (SRA), como as células musculares lisas brônquicas (BSMCs). Compreender como a IL-1 β é regulada nessas células durante a exposição à Sp do SARS-CoV-2 pode fornecer novos insights sobre as vias inflamatórias pulmonares associadas à COVID-19 e suas potenciais vias de modulação.

A interleucina-8 (IL-8), também conhecida como IL-8, é uma quimiocina pertencente à família CXC, amplamente conhecida por seu papel na mediação da resposta inflamatória, especialmente no recrutamento e ativação de neutrófilos (56). As quimiocinas, uma grande família de citocinas caracterizada por produzir um poderoso efeito quimiotático também estão envolvidas na resposta inflamatória induzida pela SARS-CoV-2, visto que foram encontradas no plasma de pacientes com COVID-19. Produzidas pelo epitélio respiratório, a IL-8/CXCL8 está envolvida na inflamação e tráfego de células imunes nas infecções por coronavírus, estimulam a migração de células imunes inatas e adaptativas para os pulmões, ativando a degranulação e a subsequente liberação de mediadores citotóxicos e inflamatórios^{60,61}. Níveis elevados de IL-8 têm sido implicados na patogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) devido ao dano tecidual provavelmente causado pela liberação excessiva de proteases de neutrófilos e espécies reativas de oxigênio (ROS)^{62,63}. Estudos mostrou que, no COVID-19 os níveis de CXCL8 no líquido de lavagem nasal se correlacionam com a gravidade dos sintomas durante infecções agudas do trato respiratório⁶⁴. Tomados em conjuntos o envolvimento das citocinas e quimiocinas na resposta inflamatória pulmonar parece parcialmente caracterizado, no entanto, a relação delas com o SRA necessita ser melhor compreendida, visto que o SARS-CoV-2 utiliza o receptor da ECA2 para penetrar no

hospedeiro e promover a infecção e possivelmente deve causar um desequilíbrio desse sistema.

Além disso, a interação entre a Sp e as células do sistema respiratório pode desencadear respostas inflamatórias exacerbadas, potencializando a susceptibilidade a complicações respiratórias em pacientes, especialmente aqueles com condições pré-existentes ⁶⁵. Portanto, compreender como a Sp do SARS-CoV-2 impacta o SRA e a produção de citocinas inflamatórias nas células musculares lisas brônquicas é essencial para elucidarmos novos alvos terapêuticos, contribuindo assim para a melhoria da gestão clínica de pacientes afetados pela COVID-19. Os resultados deste estudo não apenas expandem o conhecimento sobre a patologia associada à infecção pelo SARS-CoV-2, mas também podem oferecer insights valiosos na identificação de intervenções que visem atenuar o impacto da inflamação e restaurar a função respiratória, sendo, portanto, de relevância clínica direta.

Sendo assim, compreender a interação entre a Sp do SARS-CoV-2 e a ativação dos componentes do SRA é essencial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas voltadas para a modulação da resposta inflamatória em infecções virais respiratórias. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar também o efeito dos antagonistas do receptor AT1, losartana (LOS) e do receptor MAS, A-779 sobre a expressão dos componentes do SRA (ECA2, AT1R e MASR) e das citocinas IL-1 β e IL-8 em BSMC expostas à Sp ou a Ang II. Além disso avaliar o efeito modulatório da Ang II sobre a resposta induzida pela Sp. A compreensão desses mecanismos pode elucidar o desenvolvimento de intervenções clínicas eficientes contra os efeitos inflamatórios em quadros graves COVID-19.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos antagonistas do receptor AT1, e do receptor MAS sobre a expressão dos componentes do SRA e das citocinas IL-1 β e IL-8 em células da musculatura lisa brônquica expostas à Sp ou a Ang II. Além disso avaliar o efeito modulatório da Ang II sobre a resposta induzida pela Sp.

2.2 Objetivos específicos

Para tanto, investigamos:

- 1- A expressão gênica dos componentes do SRA nas BSMCs estimuladas pela proteína S do SARS-CoV-2 recombinante ou pela Ang II por RT-qPCR;
- 2- A expressão gênica e produção de proteína de IL-1 β e CXCL8 por RT-qPCR e ELISA respectivamente nas BSMCs estimuladas pela proteína S do SARS-CoV-2 recombinante ou pela Ang II por RT-PCR;
- 3- O papel do antagonista do receptor AT1 (losartana) sobre a expressão e produção de CXCL8 e IL-1 β , e expressão dos componentes do SRA por BSMCs estimuladas pela proteína S do SARS-CoV-2 recombinante ou Ang II;
- 4- O papel do antagonista do receptor Mas (A-779) sobre a expressão e produção de CXCL8 e IL-1 β , e expressão dos componentes do SRA por BSMCs estimuladas pela proteína S do SARS-CoV-2 recombinante ou Ang II;
- 5- O papel modulatório da Ang II sobre a expressão dos componentes do SRA e da expressão e produção de CXCL8 e IL-1 β induzida pela Sp em BSMCs.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular da musculatura lisa brônquica humana (BSMC)

As células musculares lisas brônquicas humanas (BSMC) (Lonza CC-2576) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Gibco, Thermo Scientific, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (12657029 – Gibco™); aminoácidos não essenciais, 1% (11140-050 100mL Gibco™); 2 mM de L-glutamina (G3126-100G Sigma); 1 mM de piruvato de sódio (P2256–100G Sigma); 3,7 g/mL de bicarbonato de sódio (S5761-500G Sigma); 2,6 g/L de HEPES (H4034-500G Sigma) (Sigma-Aldrich, EUA) e antibióticos, 10 mL/L de penicilina (15140122 Gibco™); 1 mL/L de anfotericina B (15290-018 Gibco) e 1 mL/L gentamicina (15710-064 Gibco™), submetidas a incubação em atmosfera controlada à 37°C com 5% de CO₂, com trocas de meio a cada dois dias até atingirem uma confluência adequada para os experimentos. Durante a passagem celular, as células aderidas foram destacadas por meio da dissociação enzimática com solução de trypsin-EDTA a 0,25% (Gibco™), e posteriormente transferidas para frascos de cultivo de maior capacidade para continuidade do crescimento celular.

3.2 Estimulação das BSMCs com proteína S recombinante do SARS-CoV-2

As BSMCs foram estimuladas com proteína Spike recombinante do SARS-CoV-2 (ptns (aa-1-1208) lote: m090221 (PBS+BIOTINA) – 500 µg, [proteína total] = 1,70 mg/mL), sem azida, gentilmente cedida pela Dra. Leda Castillo do Laboratório de Engenharia Celular e Cultura da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LECC/COPPE/UFRJ), nas concentrações de 50, 100 e 500 ng/mL, diluída em meio de cultura por 3, 12 e 24 horas, mantidas a 37 °C. Essa estimulação foi realizada com ou sem a presença de Ang II (adquirida comercialmente - A9525-10MG Sigma-Aldrich®) na concentração de 100 ng/mL. Os grupos que foram pré-sensibilizados por Ang II, as células receberam a concentração de Ang II 1h antes da estimulação com a proteína Spike e comparadas estatisticamente com o grupo que recebeu apenas o estímulo com a Sp. Sendo assim, as BSMCs foram expostas a Sp e/ou Ang II nas

seguintes condições: Sp (50, 100 e 500 ng/mL); Ang II (100 ng/mL); Ang II 1h antes + Sp com 50, 100 e 500 ng/mL.

A concentração final de Sp (100 ng/mL) usadas em experimentos subsequentes foram determinadas após a condução de uma curva concentração-resposta (10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL). A concentração de Ang II (100 ng/mL) foi determinada também após a condução de uma curva concentração-resposta (10, 100 e 1000 ng/mL) (dados não mostrados). Apenas 3 e 12 horas foram mantidas para os experimentos de curso de tempo nas análises subsequentes com os antagonistas dos receptores.

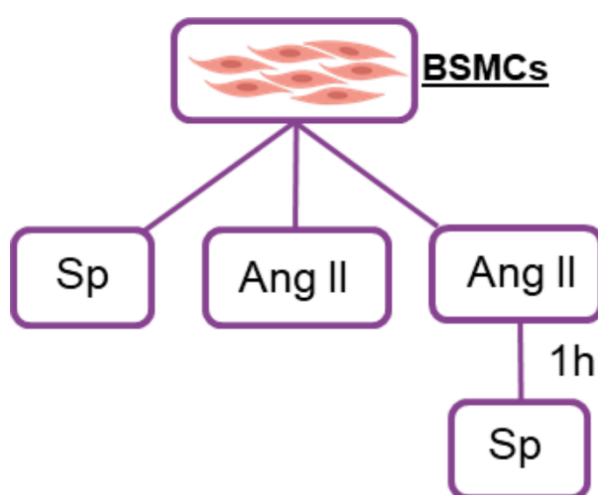


Figura 3. Esquema representativo do protocolo estabelecido para estimulação das BSMCs com Sp e Ang II.

3.3 Ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade dos estímulos

A toxicidade da proteína S foi avaliada usando o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Células viáveis podem reduzir o MTT amarelo clivando o anel de tetrazólio em um formazan azul-púrpura insolúvel que precipita no citosol celular e pode ser dissolvido após a lise celular. Em contraste, células mortas não podem transformar o MTT devido a danos tóxicos. A reação é mediada por desidrogenases – enzimas associadas ao retículo endoplasmático e mitocôndrias (Fotakis e Timbrell, 2006). Primeiro, as BSMCs foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de $1,6 \times 10^4$. Após o período de adesão celular, o meio é aspirado suavemente, e estimulação com Sp (50, 100 e 500 ng/mL) e Ang II (100 ng/mL) é adicionada e incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 3 e 12 horas. Em

seguida, os estímulos são removidos, e 200 μ L de solução de MTT (5 mg/mL em meio de cultura sem soro fetal bovino) são adicionados a cada poço e incubados por 2 horas. Posteriormente, a solução de MTT é removida, e o formazan intracelular é solubilizado com 200 μ L de isopropanol. A absorbância foi medida a 570 nm usando um dispositivo leitor molecular de microplacas Spectramax 190.

3.4 Tratamento das BSMCs com os antagonistas dos receptores do SRA

O antagonista do receptor AT1, losartana (LOS) (SML3317-10MG Sigma-Aldrich®) e antagonista do receptor MAS, A-779 (SML1370-5MG Sigma-Aldrich®), foram utilizados neste estudo. As BSMCs foram pré-tratadas com LOS (diluído no meio de cultura) 1 h antes do estímulo das células com a Sp, na concentração de 2 μ M. E para o A-779, as células foram pré-tratadas 2 h antes do estímulo das células com Sp (diluído em meio de cultura), na concentração de 100 nM. Os grupos delimitados no ensaio seguem o seguinte protocolo: Controle; Sp (100 ng/mL); LOS (2 μ M) + Sp; A-779 (100 nM) + Sp; Ang II (100 ng/mL); LOS + Ang II; A-779 + Ang II; Ang II + Sp; LOS + Ang II + Sp e A-779 Ang II + Sp.

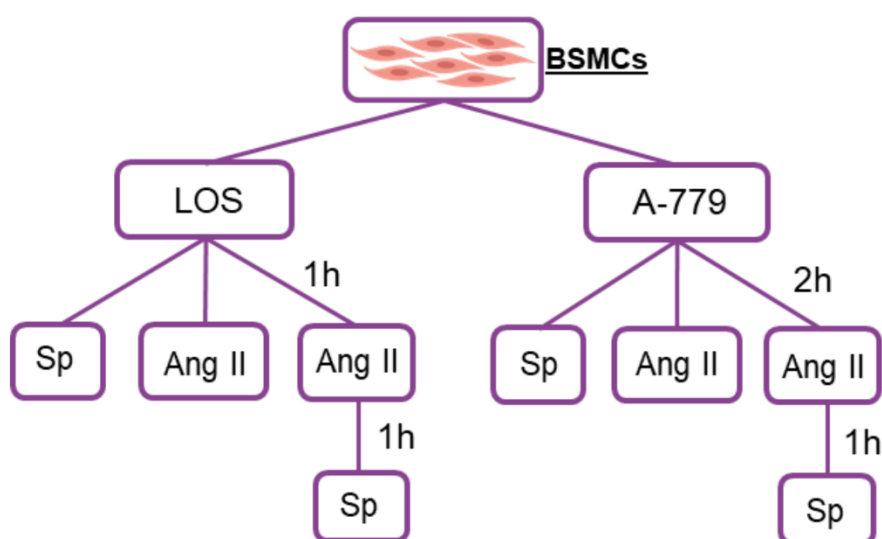


Figura 4. Esquema representativo do protocolo estabelecido do pré-tratamento nas BSMCs com os antagonistas dos receptores AT1 (LOS) e MAS (A-779) seguido da estimulação com Sp e Ang II.

3.5 Análise da expressão gênica dos componentes do SRA e das citocinas por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

3.5.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras destinadas a referida análise foi realizada em ambiente estéril, limpo com o reagente de descontaminação RNase Away™ (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA) e em tubos com especificação PCR clen (livre de DNase/RNase). As amostras de células musculares lisas brônquicas em cultura foram submetidas a 300µL de reagente Trizol LS ((Invitrogen™) seguida de homogeneização rigorosa. O homogenato foi transferido para um micro tubo de 1,5 mL e armazenados a -80 °C, até a realização das seguintes etapas.

3.5.2 Extração e quantificação do RNA total

A extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol LS (Invitrogen™), com protocolo adaptado a partir do recomendado pelo fabricante. As amostras foram descongeladas e o volume de Trizol LS foi completado até 1 mL. Em seguida 200 µL de clorofórmio foi adicionado, seguido de rigorosa homogeneização em agitador vórtex (2800 rpm; 15 segundos) (sucessivamente, cada um no momento da adição do clorofórmio) e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi coletada (+/- 500 µL) e transferidos para tubos limpos. Para precipitação do RNA foram adicionados 500 µL de isopropanol, e as amostras foram mantidas a -20 °C por overnight. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (13000 RCF; 15 minutos; 4°C), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi reservado no tudo (+/- 100 µL), o pellet formado foi lavado em etanol 75% e novamente centrifugado (10000 RCF; 10 minutos; 4°C), o sobrenadante foi descartado e o residual de solução foi evaporado com o tubo invertido. O precipitado foi diluído em 20 µL de água-DEPC e as amostras foram armazenadas a -80 °C, até os procedimentos seguintes.

A quantificação do RNA total foi realizada usando um espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek®) com equipamento Nanodrop (Take3, BioTek), seguindo as recomendações do fabricante. Além disso, a pureza das amostras foi avaliada por

espectrofotometria com leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (para ácidos nucleicos), 280 nm (para proteínas) e 230 nm (para fenol), considerando as razões 260/280 (satisfatória entre 1.8 - 2.0) e 260/230 (satisfatório entre 2.0 – 2.2).

3.5.3 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia de polimerase em tempo real

Com o objetivo de eliminar possíveis contaminações por DNA genômico, anteriormente a transcrição reversa, as amostras foram tratadas com kit DNase I (SigmaAldrich), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi então sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, utilizando o Kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação comparativa da expressão dos diferentes alvos foi realizada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) usando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Para as reações, os ensaios foram conduzidos utilizando o reagente TaqMan® (TaqMan™ Gene Expression Master Mix Assays Applied Biosystems™), com ensaios inventoriados com sonda conjugada a fluoróforo FAM e VIC e extintor MGB (FAM fluorophore reporter / non fluorescent quencher MGB), seguindo as instruções do fabricante, para os alvos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados

Componentes do SRA		
Ace2	Angiotensin I converting enzyme 2	Hs01085333_m1
Ace	Angiotensin I converting enzyme	Hs01104604_m1
Agtr1	Angiotensin II receptor type 1	Hs00258938_m1
Agtr2	Angiotensin II receptor type 2	Hs02621316_s1
MASR	MAS receptor	Hs01936726_s1
Citocinas		
IL-1β	Interleukin 1 beta	Hs01555410_m1

CXCL8	chemokine 8	Hs00174103_m1
Gene constitutivo		
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1

3.5.4 Análises dos dados de expressão gênica

Os níveis de expressão dos genes alvos foram determinados por método de Ct comparativo, com a equação Quantificação Relativa (RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁶⁶. De maneira breve, para o cálculo do RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de Ct (cycle threshold ou ciclo limiar) do gene alvo e constitutivo (GAPDH). O valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do gene constitutivo, resultando no valor de ΔCt ; que por sua vez foi subtraído do valor do ΔCt do calibrador (grupo referência, Controle), para resultar no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi utilizado na fórmula do RQ, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do constitutivo ⁶⁶.

3.6 Ensaio ELISA sandwich (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para quantificação da citocina interleucina-1 β (IL-1 β), e quimiocina CXCL8, foi utilizada a técnica ELISA sandwich usando o Sistema de Desenvolvimento ELISA DuoSet® - Kits ELISA (R&Dsystems), brevemente descrita a seguir. Primeiramente, microplacas (96 poços) foram incubadas com os respectivos anticorpos de captura diluídos em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KHPO4 2 mM, e Na2HPO4 8 mM) (16 horas, 4°C) (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) overnight. No dia seguinte as placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS, Tween 20 1%) e bloqueadas com solução de albumina sérica bovina 1% (ASB 1% em PBS) (1 hora, temperatura ambiente). Em seguida, as placas foram novamente lavadas, e foram incubadas as respectivas curvas padrões (250 pg/mL para IL-1 β e 2000 pg/mL, para IL-8, diluição seriada de 2x em ASB 1%) e as amostras (2 horas, temperatura ambiente). As placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos biotinilados (1 hora, temperatura ambiente). Posteriormente as placas foram lavadas e incubadas com Streptavidin-HRP B (presente no Kit DuoSet®) (30 minutos, temperatura

ambiente, no escuro). As placas foram então lavadas e incubadas com o substrato cromogênico (solução de TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (30 minutos, temperatura ambiente, no escuro). Ao final, a reação de cor foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M, as absorbâncias foram determinadas em 450 nm, as concentrações dos alvos nas amostras foram determinadas em relação a curva padrão. Os alvos utilizados encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos Kits DuoSet utilizados (R&D systems)

Alvo	Anticorpo de captura	COD
IL-1 β	Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA	DY201-05
CXCL-8	Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	DY208-05

3.7 Imunocitoquímica de fluorescência ICC/IF

Ensaio de imunofluorescência foram realizados em BSMC para avaliar a expressão proteica dos componentes do SRA. As BSMCs foram cultivadas em lamínulas de vidro redondas em placas de 24 poços. As lamínulas foram limpas com etanol 70%, revestidas com gelatina 0,1%, esterilizadas utilizando a luz UV do fluxo laminar por 15 minutos e em seguida as células são semeadas na densidade ideal para o ensaio ($2,5 \times 10^4$). Foram mantidas em cultura até aderência total das células a lamínula. Após o tempo de cultura apropriado, as células foram estimuladas e tratadas de forma já descrita. Após o tempo adequado para análises dos alvos (ECA2), o meio contendo o tratamento foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos à temperatura ambiente, seguidas de três lavagens com PBS 1x. As células foram então bloqueadas com PBS 1x contendo 4% de ASB (por 1 hora, em temperatura ambiente, sobre leve agitação constante). Em seguida os anticorpos primários (ACE2 sc-390851) foram diluídos em solução de bloqueio 1% e foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C, com os poços de controle negativo recebendo apenas a solução de bloqueio. Em seguida, após três lavagens de 5 minutos com 0,1% de Tween-20 em PBS 1x, foi utilizado como anticorpo secundário o Alexa flúor 488 anti-mouse (Invitrogen), (1 hora, em temperatura ambiente, sobre leve agitação constante, sob proteção da luz), seguido

pelo mesmo procedimento de lavagem. Antes do final da incubação do anticorpo secundário, 10 µL de solução de DAPI (D9542 Sigma-Aldrich®) (diluição de 1:2000 em PBS 1x) foi adicionada para coloração do núcleo. Por fim, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio utilizando solução de montagem fluoroshield (Sigma - F6182). Durante o procedimento, as células foram mantidas hidratadas para evitar o ressecamento e minimizar a fluorescência de fundo.

As imagens foram obtidas usando microscópio de fluorescência (Olympus BX53, Tokyo, Japan) combinado com uma câmera acoplada (Olympus XC50, Tokyo, Japan), utilizando o sistema Olympus CellSens com ampliação de 20x.

3.8 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram avaliados pelos testes de Shapiro-Wilk, e a partir destes resultados, foi aplicado teste paramétrico, análise de variância de um fator (one-way ANOVA), seguido de teste post hoc de Sidák, incluindo as comparações Controle vs Sp, Controle vs Ang II, Sp vs LOS+Sp, Sp vs A779+Sp, Sp vs Ang II+Sp, Ang II+Sp vs Ang II+Sp+LOS, Ang II+Sp vs Ang II+Sp+A779, Ang II vs Ang II+LOS, Ang II vs Ang II+A779.

Os gráficos representam os dados como a média e o desvio padrão da média (SD, standard deviation of the mean). Os níveis de significância são indicados pelo valor ajustado de p, como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), e **** ($p < 0.0001$). As análises foram realizadas no software estatístico Graph Pad Prism v9.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, Califórnia, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características morfológicas das BSMC em cultura

As BSMCs são células aderentes e mostram sua morfologia quando fixadas e espalhadas no fundo do frasco e/ou poços de cultura. Elas apresentam-se de forma alongada e fusiforme, características típicas da morfologia das células musculares lisas. Além disso, elas são organizadas paralelamente e densamente, dispostas em feixes compactos. No entanto, quando coradas com H&E, o núcleo alongado e centralizado, característico do músculo liso, é mais claramente observado (Figura 3).

Em ambas as imagens, células musculares lisas brônquicas saudáveis são evidentes, mantendo uma morfologia característica que sugere função contrátil adequada. A coloração H&E permite melhor visualização dos detalhes celulares, incluindo a estrutura dos núcleos e a distribuição do citoplasma. Ao mesmo tempo, a imagem não corada fornece uma visão geral da arquitetura celular em cultura. Essa morfologia é crucial para estudos de função e respostas a estímulos e pesquisas em patologias respiratórias e resposta a agentes terapêuticos.

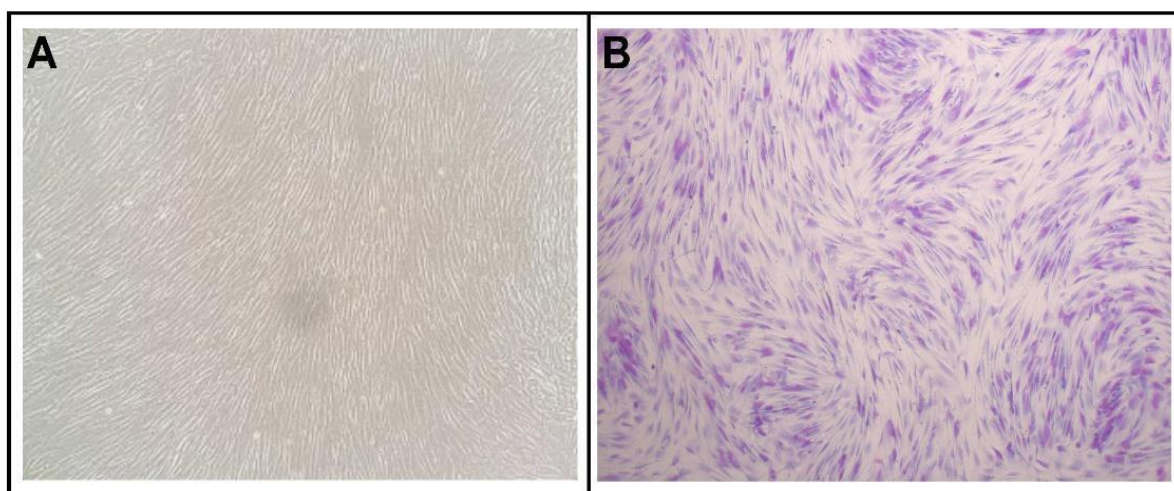


Figura 5. Imagens da morfologia celular das BSMC sob microscopia montada em câmera invertida. A) BSMC em cultura, cultivada em DMEM + 10% SFB, aminoácidos não essenciais (NAA) + piruvato. B) Coloração H&E de BSMC, usando o kit Panótico de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram registradas com ampliação de 10x.

4.2 A concentração de proteína Spike não afetou a viabilidade celular das BSMC

Para avaliar se as concentrações de Sp utilizadas no presente estudo eram tóxicas para as BSMCs, foi empregado o ensaio de viabilidade celular baseado na técnica de MTT. Esse teste de citotoxicidade foi realizado nas culturas de BSMCs estimuladas com Sp nas concentrações de 50, 100 e 500 ng/mL por 3 e 12 horas, a fim de investigar os efeitos da Sp como uma possível condição de infecção. Os resultados indicaram que as concentrações utilizadas de Sp aplicadas nos ensaios não afetaram a viabilidade celular, mesmo quando combinadas com Ang II.

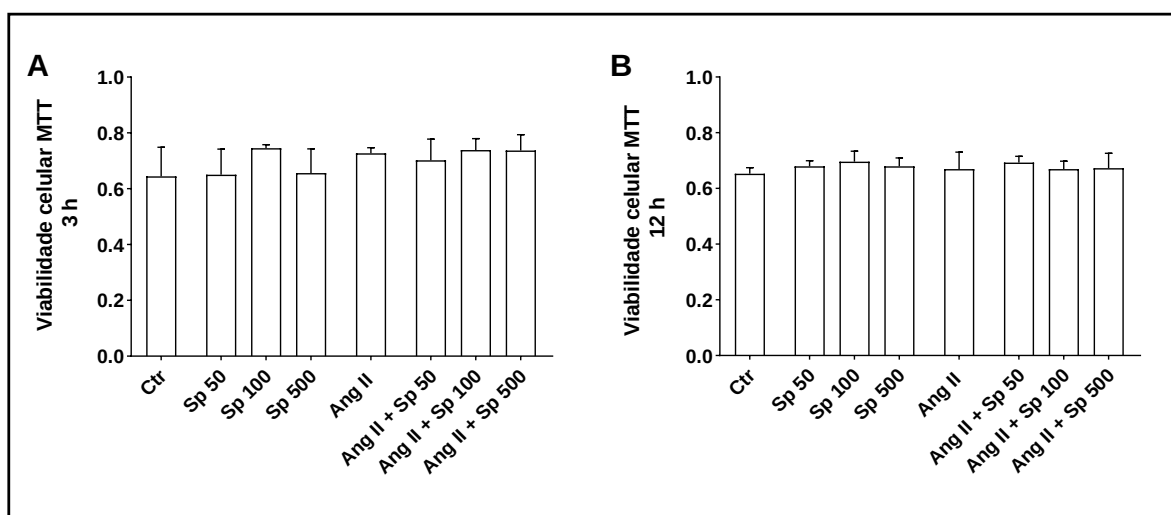


Figura 6. Ensaio MTT. Viabilidade celular das BSMCs, expostas a proteína Spike (50, 100 e 500 ng/mL) e/ou Ang II (100 ng/mL) avaliadas por 3 horas (A) e 12 horas (B). As barras representam o resultado da média $\pm$ SD. Os valores são considerados significativos quando $p > 0,05$.

4.3 A proteína S do SARS-CoV-2 aumenta a expressão gênica do receptor AT1, da ECA2 e do receptor MAS e a Ang II modula essa expressão

Inicialmente, identificamos e padronizamos a concentração de proteína S para estimular as BSMC, (Sp: 50, 100 e 500 ng/mL). A concentração de 50 ng/mL não conseguiu induzir a expressão de AT1R, ECA2 e MASR em nenhum dos momentos avaliados em comparação ao grupo controle (Figura 7, Figura 8 e Figura 9). A proteína S induziu um aumento significativo na expressão de AT1R na concentração de 100 ng após 3 ($p < 0,001$) e 12 h ($p < 0,05$), elevando-se mais ainda no tempo de 24h

comparada ao grupo controle. A estimulação por Ang II (100 ng/mL) mostrou um aumento estatisticamente significativo na expressão de AT1R 3 (p < 0,05) e 24h (p < 0,01) após, mas não aumentou no período de 12h quando comparada com o grupo controle. A sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação com Sp não alterou a expressão de AT1R no período de 3h e 12h (figura 7A-B). No entanto, após 24h, houve um aumento robusto e estatisticamente significativo da expressão de AT1R no grupo sensibilizado com Ang II 1h antes da Sp (500 ng/mL) quando comparado ao respectivo grupo controle (p < 0,001) (Figura 7-C). Esses resultados sugerem que as BSMCs estimuladas e sensibilizadas com Ang II aumentam a expressão de AT1R quando expostas por um maior período de tempo, sugerindo que uma maior disponibilidade de Ang II por mais tempo causa a hiper expressão do receptor AT1.

Os dados apresentados do grupo que foi estimulado com 500 ng/mL, mostrou moderada diminuição da expressão gênica desse alvo, possivelmente devido à saturação da enzima e receptor da proteína Spike, ACE2, pela quantidade de Sp que pode exceder a capacidade enzimática.

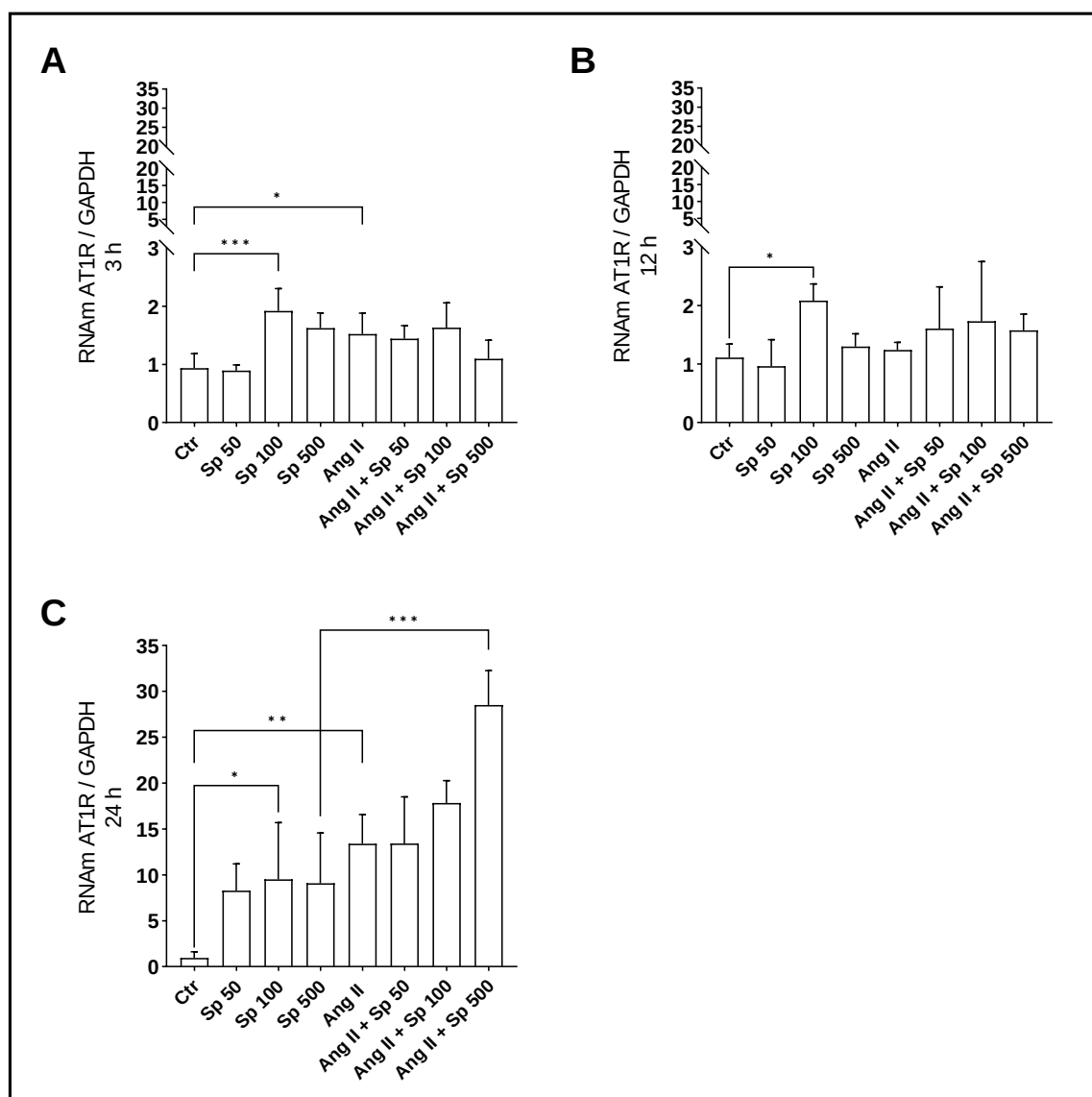


Figura 7. Expressão do mRNA do receptor AT1R. As BSMCs foram estimuladas com diferentes concentrações da Sp (50, 100 e 500 ng/mL) ou com Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp por 3 horas (A), 12 horas (B) e 24 horas (C). O grupo controle (Ctr) representa células não tratadas. A expressão foi quantificada por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno e comparados ao grupo controle. Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), com análise estatística por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Sidák. Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

A estimulação com Sp induziu um aumento significativo na expressão de ECA2, nas concentrações de 100 ng/mL e 500 ng/mL ($p < 0,0001$) após 3h, mas não após 12 e 24h quando comparada com o grupo controle. A estimulação com Ang II (100 ng/mL) também resultou em uma maior expressão de ECA2 no período de 3h, ($p < 0,01$) quando comparada com o grupo controle. A sensibilização com Ang II + Sp (100 e 500 ng/mL) inibiu a expressão de ECA2 também após 3h quando comparada aos respectivos grupos controle (Figura 8-A). No período de 12 e 24h, a estimulação com

Sp e Ang II ou a sensibilização com Ang II 1h antes da Sp não mostrou alteração estatisticamente significativas na expressão gênica de ECA2 nas BSMCs (Figura 8-B e C). Concluímos, a partir desses resultados, que Sp e Ang II aumenta a expressão de ECA2 nas BSMCs, e a sensibilização com Ang II 1h antes da Sp modula negativamente essa expressão no primeiro momento de exposição.

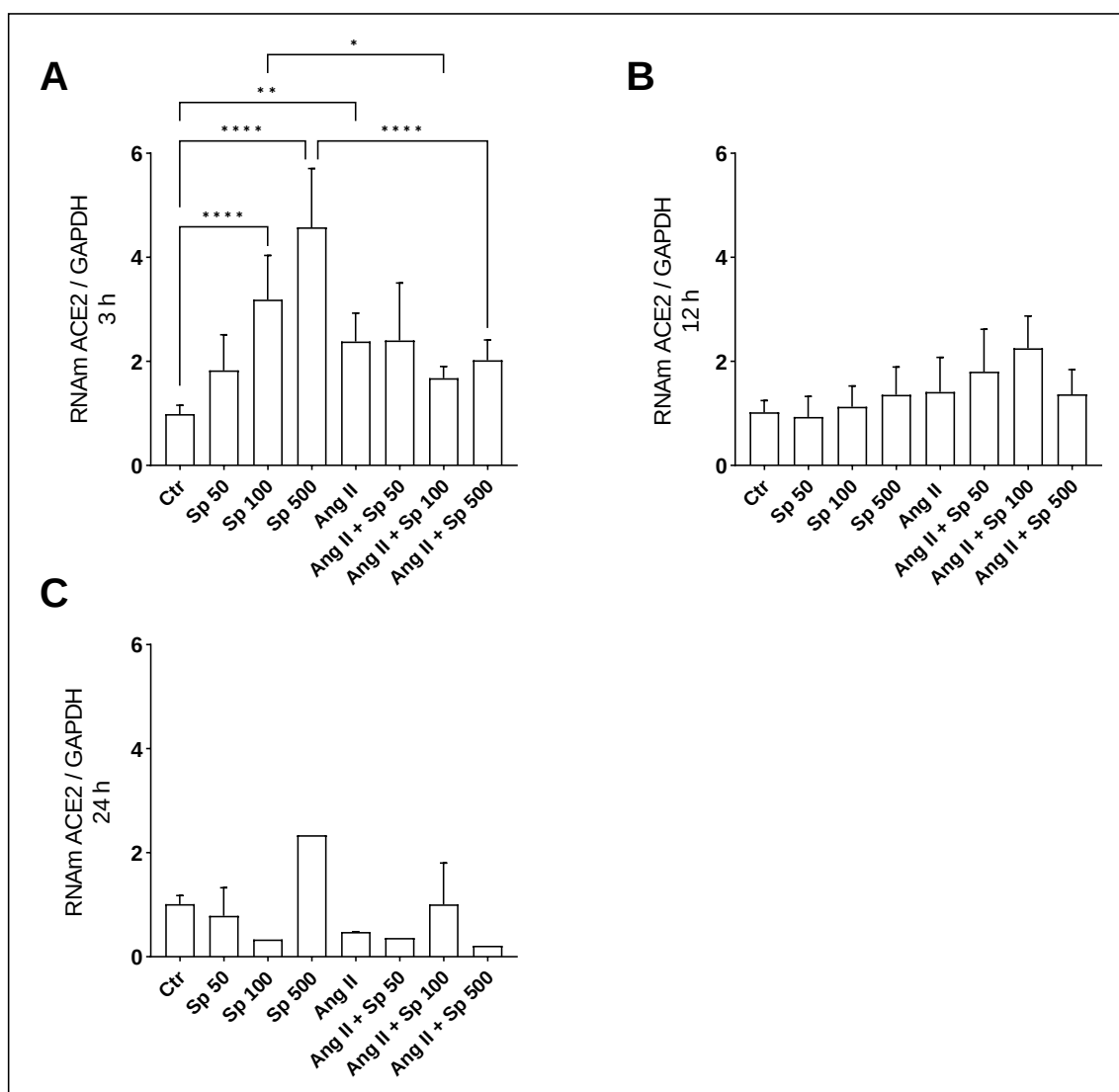


Figura 8. Expressão do mRNA de ECA2. As BSMC foram estimuladas com diferentes concentrações da Sp (50, 100 e 500 ng/mL), ou com Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp por 3 horas (A), 12 horas (B) e 24 horas (C). A expressão foi quantificada por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno e comparados ao grupo controle. Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), e analisados por ANOVA seguida do teste de Sidák. Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Com relação ao MASR, após 3h observou-se um aumento na expressão do MASR nas células estimuladas com 100 ng/mL de Sp em comparação ao controle ($p < 0,05$). A estimulação com Ang II ou a sensibilização com Ang II 1h antes da

estimulação com a Sp não resultou em aumentos significativos quando comparada ao grupo com Sp sozinha (Figura 9-A). A expressão elevada de MASR induzida pela Sp na concentração de 100 ng/mL foi mantida até o período analisado de 24 h (Figura 9-A-C). A concentração de Sp 500 ng/mL induziu aumento estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,0001$) 12h após. A estimulação por Ang II (100 ng/mL) mostrou aumento da expressão de MASR semelhante a observada pela Sp no tempo de 12h quando comparada ao grupo controle. A sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp 100 ng/mL provocou grande aumento observado, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), quando comparada ao grupo com Sp sozinha (Figura 9-B), esses achados sugerem que a sensibilização prévia com Ang II pode favorecer a ativação de vias inflamatórias mediadas pelo receptor AT1R, responsável pelos efeitos pró-inflamatórios do SRA. Essa ativação pode levar ao aumento da expressão de ACE2, o que, por sua vez, favorece a conversão de Ang II em Ang-(1-7) e, conseqüentemente, promove a expressão do receptor MAS. Esse padrão sugere a existência de um possível mecanismo de feedback compensatório, com o objetivo de restaurar o equilíbrio entre os eixos pró e anti-inflamatórios do SRA, contribuindo para a modulação da resposta inflamatória nas células estimuladas. No período analisado de 24h, os níveis de expressão de MASR mantiveram-se elevados com diferença estatisticamente significativa apenas nos grupos estimulados com Sp 100 ng/mL e estimulados com Ang II (100 ng/mL) isoladamente ($p < 0,05$). Embora os grupos sensibilizados com Ang II 1h antes da Sp tenham se mostrado moderadamente elevados, eles não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 9-C). Observamos que a expressão de MASR é aumentada desde o início da exposição com Sp e se mantém elevado até o período avaliado de 24h, sugerindo que a via mediada pelo receptor MAS pode estar atuando na infecção com SARS-CoV-2 na tentativa de reduzir os danos inflamatórios causados pelo vírus.

A expressão de AT2R não foi detectada após a estimulação por Sp, Ang II ou a sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp e a expressão de ACE foi observada, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparada ao controle (dados não mostrados).

Dessa forma, de acordo com os ensaios de tempo e dose-resposta da Sp, a concentração de Sp escolhida para os demais ensaios foi de 100 ng/mL, sendo avaliadas nos tempos de 3 e 12 h após a estimulação.

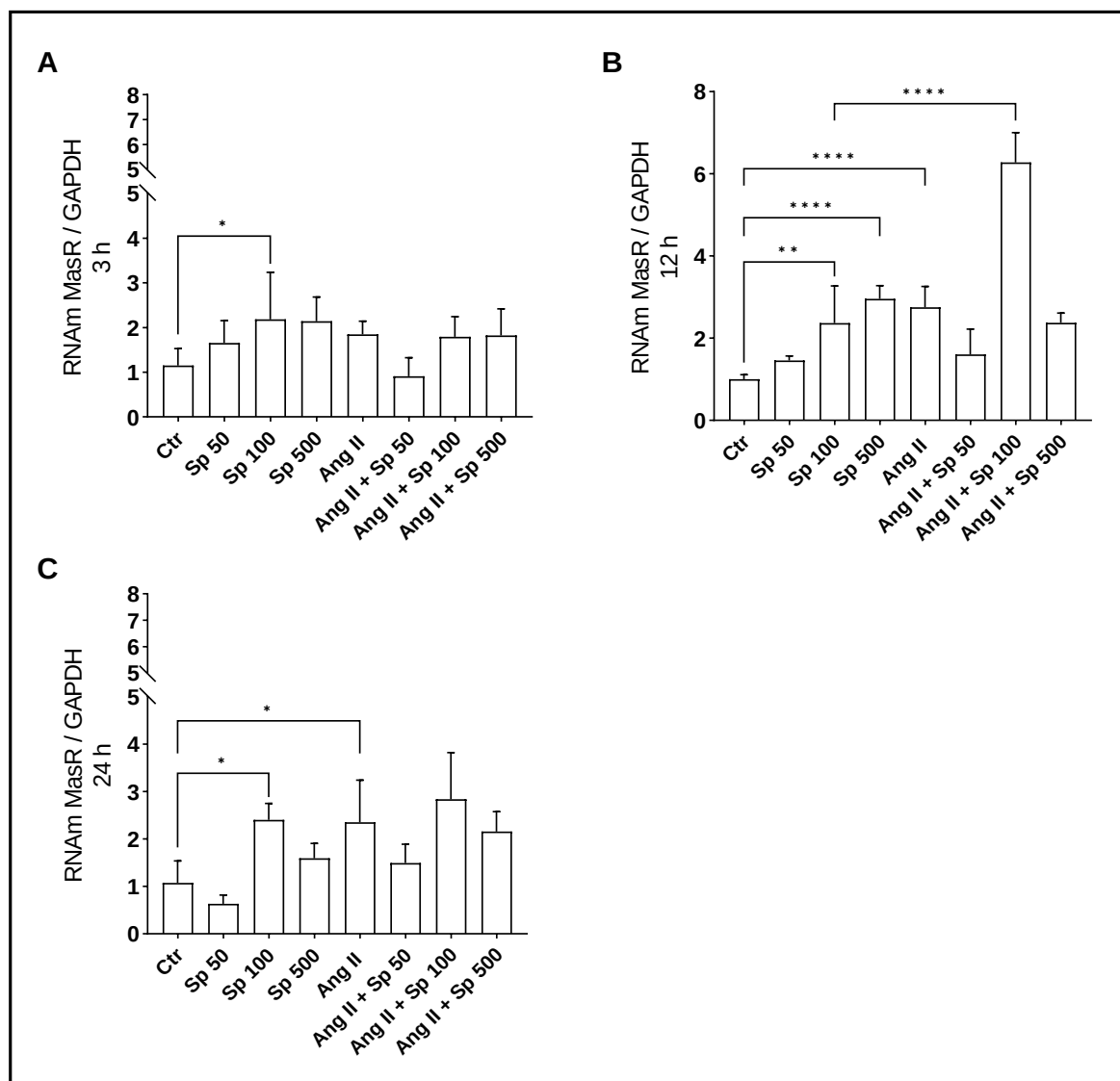


Figura 9. Expressão do mRNA do receptor MAS. As BSMC foram estimuladas com diferentes concentrações da Sp (50, 100 e 500 ng/mL), ou com Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp, por 3 horas (A), 12 horas (B) e 24 horas (C). A expressão foi quantificada por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno e comparado ao grupo controle. Os resultados representam média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$), com análise estatística por ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Sidák. Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

4.4 Antagonistas dos receptores do AT1 e MAS diminuem a expressão gênica do receptor AT1 e MAS em BSMC estimuladas com proteína S do SARS-CoV-2 e/ou Ang II

A expressão gênica dos alvos de AT1R, ECA2 e MASR nas BSMC estimuladas com Sp (100 ng/mL) ou Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes da

estimulação por Sp na presença de antagonistas seletivos dos receptores AT1 (LOS 2 μ M) ou, MAS (A-779 100 nM) foram analisados por RT-qPCR (Figura 10).

Após o período de 3h, no grupo estimulado com Sp observou-se um aumento significativo na expressão do mRNA de AT1R em comparação ao grupo controle ($\# = p < 0,0001$), esse aumento foi mantido até o período analisado de 12 h (Figura 10-A e B). No entanto, o pré-tratamento com LOS inibiu totalmente a expressão de AT1R induzida pela Sp após 3h ($p < 0,0001$), mas parcialmente após o período de 12h ($p < 0,05$). Esse efeito da LOS foi observado também nas células estimuladas com Ang II que mostraram um aumento da expressão das AT1R às 3h, mas não após 12 h. Na sensibilização com Ang II 1h antes da estimulação por Sp ocorreu essa redução também pelo pré-tratamento com a LOS ($p < 0,0001$). O bloqueio do receptor MAS com A-779 também atenuou o aumento da expressão de AT1R induzida pela Sp ($p < 0,0001$) e pela Ang II ($p < 0,001$), e o induzido pela sensibilização por Ang II 1h antes da Sp ($p < 0,01$) no período de 3h (figura 10 - A). Indicando que a expressão de AT1R induzida pela Sp e Ang II dependem da ativação dos receptores AT1 e MAS.

Após 12 h de tratamento, a ação do antagonista de MASR, A-779 mostrou-se mais evidente nesse período em células sensibilizadas por Ang II 1h antes da estimulação por Sp com um aumento estatisticamente significativo em comparação ao grupo Ang II + Sp sem tratamento ($p < 0,0001$) e também em relação ao grupo tratado com A-779 que não foram expostos a Ang II anteriormente ($p < 0,0001$) (figura 10 – B). Esses dados indicam que a modulação exercida pela Ang II sobre os efeitos induzidos pela Sp, quando associada ao tratamento com A-779, exerce uma influência mais pronunciada sobre a expressão do AT1R nas fases tardias da resposta celular. Ainda que o estímulo com Ang II isoladamente não promova alterações detectáveis nesse período, sua sensibilização prévia parece potencializar a ativação da via AT1R, sugerindo um efeito sinérgico ou prolongado sobre a regulação da resposta inflamatória.

A expressão do mRNA de ECA2 apresentou aumento significativo após 3h de estimulação com Sp ($\# = p < 0,0001$, painel C). Esse aumento foi ainda mais elevado quando as células receberam o pré-tratamento com A-779 ($p < 0,0001$), mas não por LOS. A sensibilização das células com Ang II 1h antes da estimulação por Sp gerou uma pequena redução no aumento na expressão de ECA2 induzida pela Sp nesse período ($p < 0,05$), e novamente, o uso do pré-tratamento com A-779 evidenciou o aumento de ECA2 em relação ao grupo Ang II mais Sp sem tratamento ($p < 0,01$). A

Ang II também induziu um aumento da expressão de ECA2 estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle ($\# = p < 0,001$), no entanto o pré-tratamento com LOS não alterou essa expressão, diferentemente do A-779 que potencializou a expressão de ECA2 quando comparada ao seu respectivo controle após 3h ($p < 0,0001$) (Figura 10-C). Esses resultados mostram que a expressão de ECA2 nas BSMCs induzida pela Sp ou pela Ang II não são dependentes dos receptores AT1 e MAS, porém essa expressão é potencializada quando usamos A-779 para bloquear o receptor MAS. Além disso, a sensibilização com Ang II 1h antes da Sp modulou negativamente a expressão de ECA2 induzida pela Sp.

No entanto, após 12h (painel D), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estimulados com Sp ou com Ang II, ou com a sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp com ou sem tratamento com os antagonistas dos receptores da Ang II e da Ang1-7 do SRA.

A expressão do receptor MAS, representante do eixo alternativo anti-inflamatório do SRA, também foi modulada pela presença da proteína Spike. Após 3h (painel E), a estimulação com Sp levou a um aumento significativo da expressão de MASR ($\# = p < 0,0001$) comparado ao grupo controle, efeito que foi atenuado pelo pré-tratamento com LOS ($p < 0,05$) e A-779 ($p < 0,01$). A estimulação das células por Ang II também aumentou a expressão do receptor MAS ($\# = p < 0,01$), no entanto, o pré-tratamento com LOS e A-779 não alterou essa expressão. A sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp reduziu a expressão do MASR quando comparada ao seu respectivo controle Sp ($p < 0,01$), no entanto o pré-tratamento com LOS ou A779 também não modificou essa inibição (painel E).

Em 12h (figura 10-F), a expressão do receptor MAS permaneceu aumentada no grupo Sp ($\# = p < 0,0001$) e Ang II ($\# = p < 0,001$) quando comparada ao grupo controle. Entretanto, o aumento observado induzido pela Sp e Ang II foi inibido pelo pré-tratamento com LOS ($p < 0,01$) e A-779 ($p < 0,01$) (figura 10-F). A sensibilização das células por Ang II 1h antes da estimulação por Sp manteve os níveis de expressão semelhantes ao induzido apenas por Sp, efeito que foi inibido também por LOS ($p < 0,0001$) e A-779 ($p < 0,001$). Os dados mostram que a expressão do MASR induzida pela Sp e Ang II é dependente da ativação do receptor AT1 e MAS, possivelmente mediado pela ligação de seus ligantes Ang II e Ang 1-7.

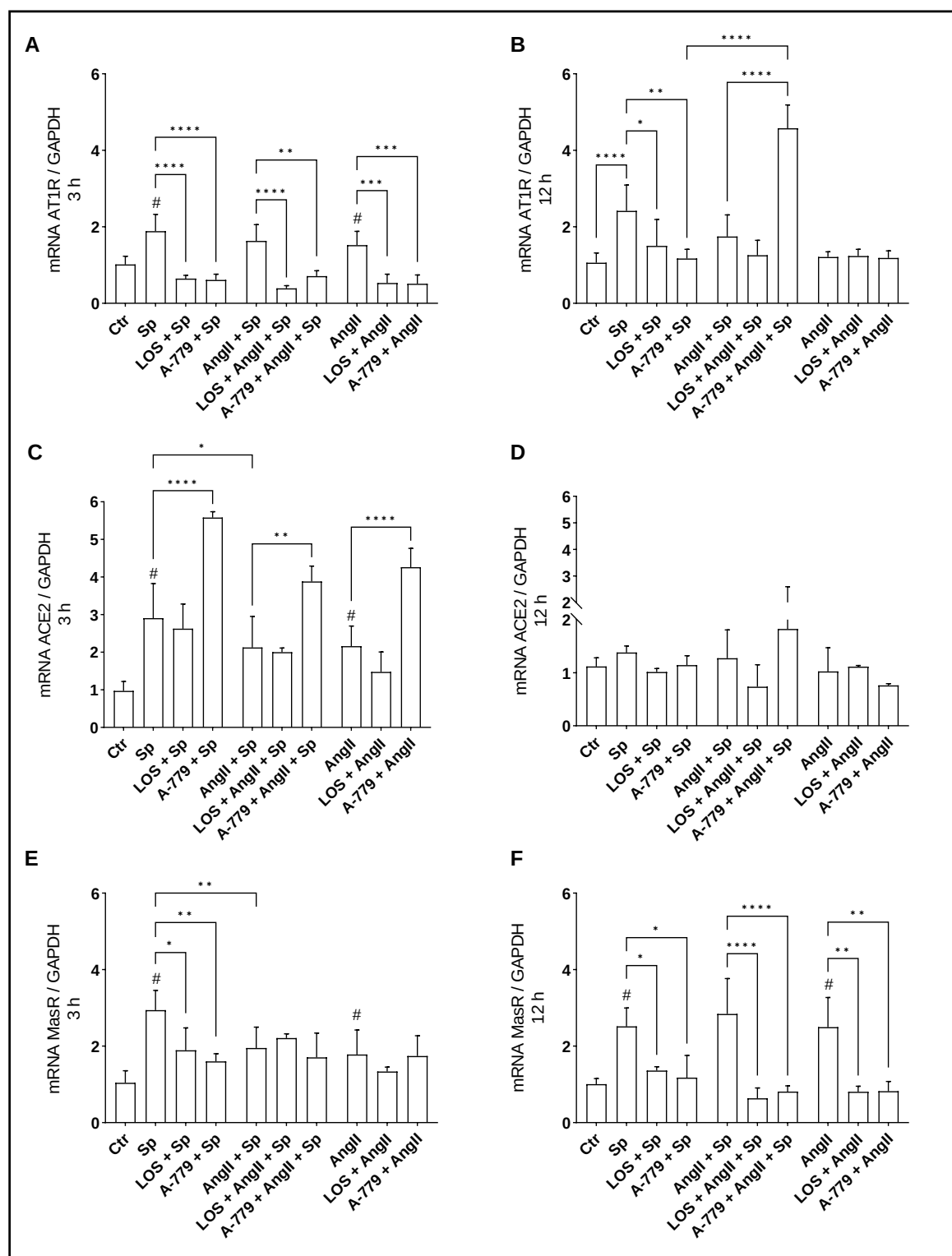


Figura 10. Expressão gênica dos componentes do SRA (AT1R, ECA2 e MASR) com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II. As células foram expostas a Sp (100 ng/mL) ou Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp com e sem tratamento com LOS (2 μ M) ou A-779 (1 μ M) por 3 e 12 horas. A expressão relativa dos genes AT1R (painéis A e B), ECA2 (painéis C e D) e MASR (painéis E e F) foram determinadas por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média de pelo menos três experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas por one ANOVA, seguida do teste de Sidák. Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

4.5 Ativação das vias AT1R e MASR modulam a expressão proteica de ECA2 mediada pela proteína Spike e pela sensibilização por Ang II seguida de Sp nas BSMCs

Após avaliarmos a expressão gênica dos componentes do RAS sobre o uso dos antagonistas dos receptores AT1 e MAS, afim de corroborar com a expressão do mRNA o próximo passo foi avaliar a produção da proteína ECA2 (mediador do processo inflamatório causado pela proteína Spike) induzida pela Sp e Ang II em BSMCs humanas e, também, o efeito da sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp sobre a produção de ECA2 por imunofluorescência após 3h (Figura 11). Nossos resultados mostraram que a exposição à Sp induziu um aumento significativo da produção de ECA2 em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). O pré-tratamento com o LOS inibiu esse aumento, retornando os níveis de ECA2 a valores semelhantes ao controle, sugerindo que Sp pode aumentar a produção de ECA2 via ativação do receptor AT1R, o que reforça a hipótese de que a célula estimulada com Sp pode estar aumentando a produção de Ang II. O uso do tratamento com A-779 não alterou a produção de ECA2 induzida pela Sp. A sensibilização com Ang II 1h antes da estimulação por Sp reduziu a produção de ECA2 comparado ao grupo estimulada com Sp apenas. A sensibilização com Ang II 1h antes do estímulo com Sp reverteu a inibição dos níveis de ECA2 induzida pela Sp após o pré-tratamento com LOS, aumentando novamente os níveis de ECA2 nas BSMCs ($p < 0,05$). Por fim, o uso combinado do pré-tratamento com A-779 seguido da sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp reduziu significativamente os níveis de ECA2 em comparação ao grupo A-779 + Sp que não foi sensibilizado pela Ang II ($p < 0,05$) (Figura 11-A). Esses resultados sugerem que o excesso de Ang II pode estar atuando por outras vias que não pelo receptor AT1, além disso, pode estar favorecendo a produção de Ang 1-7 pelo aumento da ECA2.

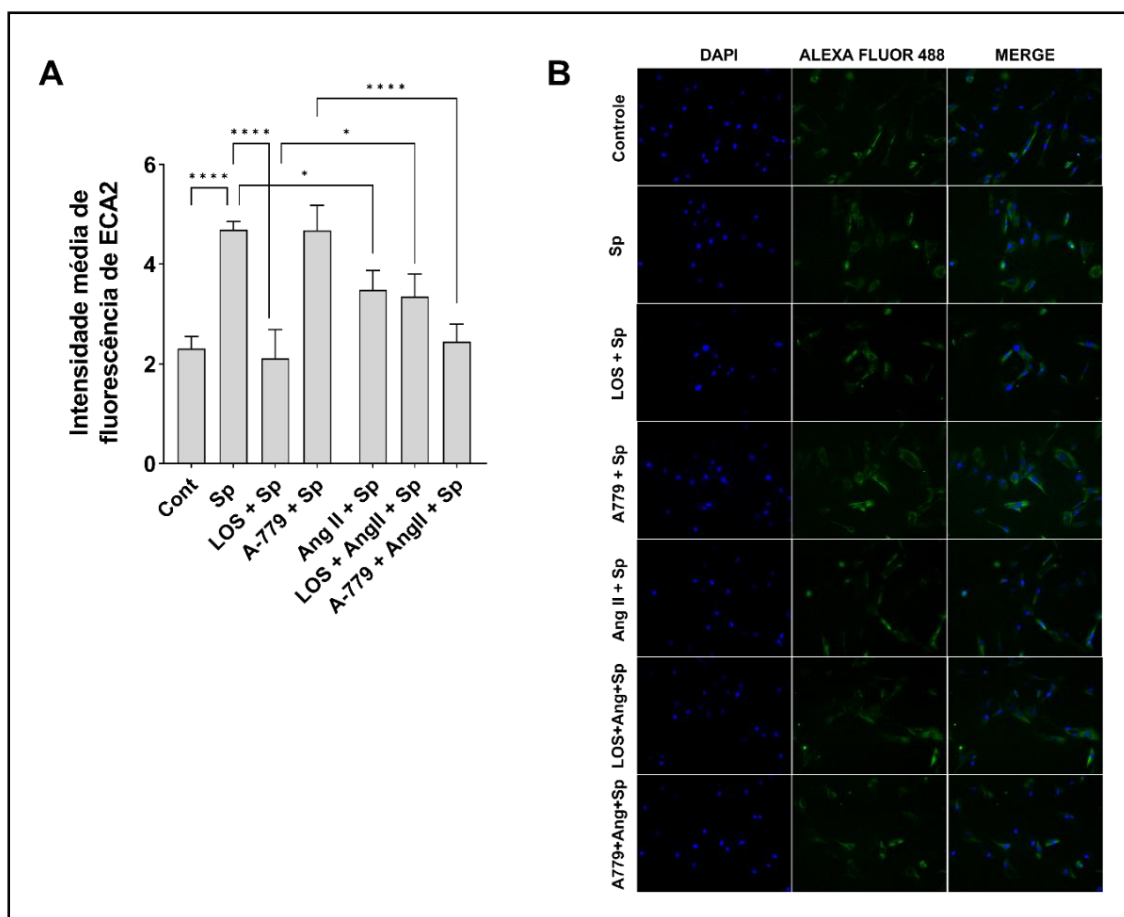


Figura 11. Intensidade média de fluorescência de ECA2 (IF). BSMCs estimuladas com Sp ou Ang II, ou sensibilizadas com Ang II 1h da estimulação com Sp com ou sem pré-tratamento com LOS e A-779. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Teste estatístico realizado por one ANOVA, seguida de pós-teste de Sidák. Diferenças estatísticas estão expressas por * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). **Ensaio de imunofluorescência comparativa**, demonstra a localização e expressão proteica nas BSMCs nas diferentes condições experimentais. Os painéis representam marcação nuclear com DAPI (azul), marcação específica com Alexa Fluor 488 (verde) e sobreposição (merge) das marcações. As condições experimentais incluem: grupo controle, Sp, LOS+Sp, A-779+Sp, Ang II+Sp, LOS+AngII+Sp, A-779+AngII+Sp.

4.6 A proteína Spike do SARS-CoV-2 aumenta a expressão de IL-1 β e IL-8 em BSMCs e a Ang II modula essa resposta

Para analisar se a proteína S recombinante foi capaz de desenvolver uma resposta inflamatória nas BSMC, analisamos a expressão de mRNA de IL-1 β e IL-8. Os resultados mostraram que Sp induziu um aumento estatisticamente significativo da expressão de mRNA de IL-1 β , principalmente na concentração de 100 ng/mL ($p < 0,0001$), quando comparado ao controle no período de 3h. Esse aumento foi mantido até o período avaliado de 12h (Figura12-A e B). Ang II aumentou a expressão de IL-1 β quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) após o período de 12h, mas não

em 3h (Figura12-B). Os grupos sensibilizados com Ang II 1h antes da estimulação por Sp mostraram modular negativamente a expressão de IL-1 β após os períodos avaliados quando comparada aos respectivos grupos controle Sp ($p < 0,0001$) (Figura12-A e B). Com exceção do grupo sensibilizado com Ang II 1h antes da Sp 500 ng/mL no período de 3h que mostrou um aumento na expressão de IL-1 β em relação ao grupo sem a sensibilização (Figura12-A).

Em relação a expressão de IL-8, foi significativamente aumentada pelo estímulo com Sp 100 ng/mL ($p < 0,0001$), semelhante ao padrão observado para IL-1 β no período de 3h (Figura12-C). A estimulação com Ang II não modificou a expressão de IL-8 quando comparada ao grupo controle no período de 3h, mas mostrou moderado aumento no período de 12h ($p < 0,01$) (Figura12-D). Quanto a sensibilização com Ang II 1h antes da estimulação por Sp (100 ng/mL) reduziu a expressão quando comparada ao seu grupo controle com Sp (100 ng/mL) 3h após o estímulo ($p < 0,0001$) (Figura12-C). No tempo de 12h, a expressão de IL-8 aumentou após estimulação com 50 ng/mL e 100 ng/mL de Sp, quando comparada ao grupo controle com significância estatística ($p < 0,05$). O grupo sensibilizado por Ang II 1h antes da estimulação por Sp 100 ng/mL modulou negativamente a expressão de IL-8 quando comparado ao grupo controle Sp 100 ng/mL ($p < 0,01$) (Figura12-D).

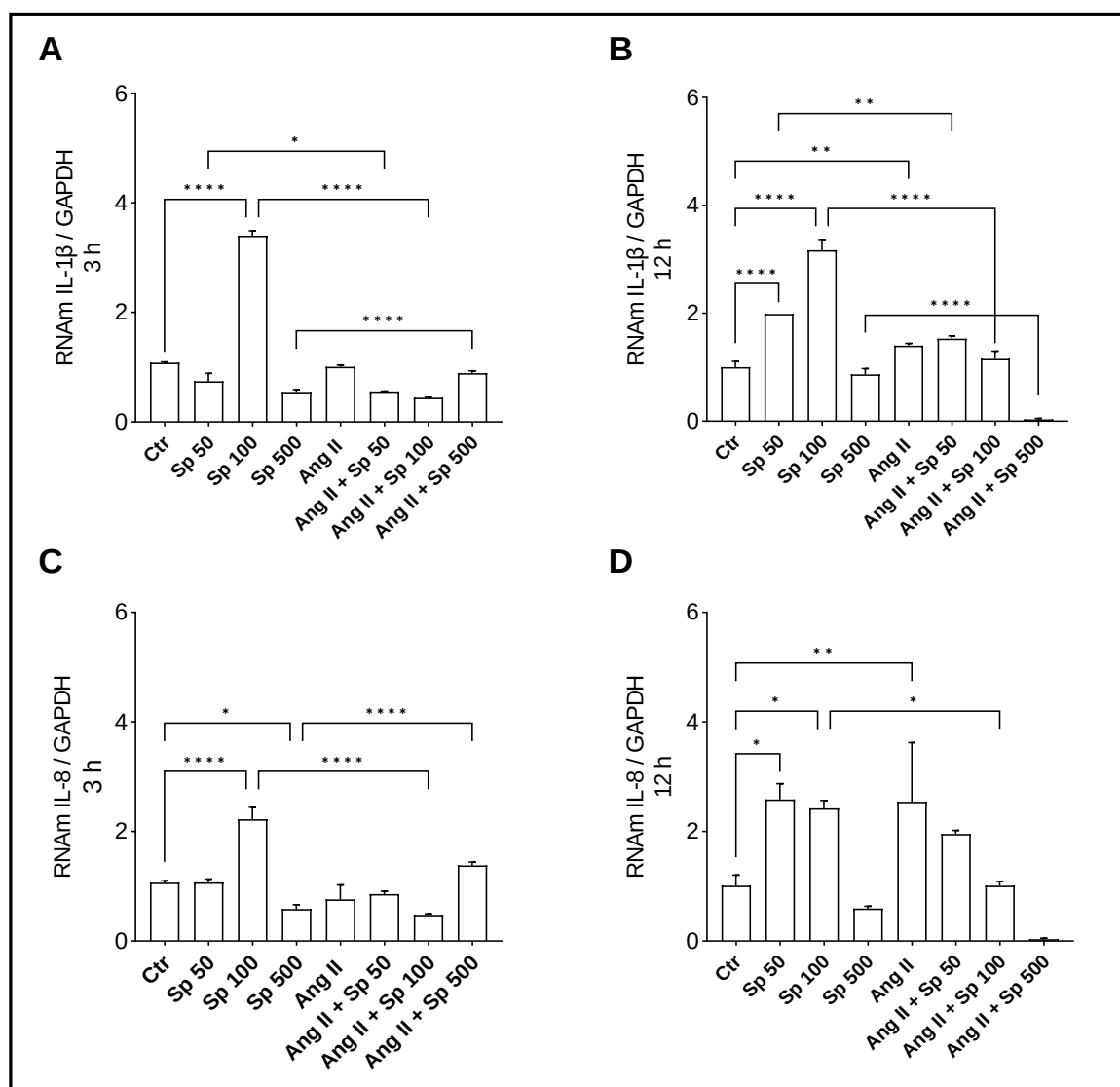


Figura 12. Expressão do mRNA de IL-1 β e IL-8. Ensaio de padronização da concentração da Sp. Expressão gênica de IL-1 β (A e B) e IL-8 (C e D) em BSMCs estimuladas com diferentes concentrações de Sp [50, 100 e 500 ng/mL] e Ang II [100 ng/mL] ou sensibilizadas com Ang II 1h antes da estimulação com Sp, por 3 horas (A e C) e 12 horas (B e D). A expressão foi quantificada por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno. Gráficos de barras mostram os resultados que são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). Análise estatística realizada por ANOVA de uma via com teste de Sidák. Diferenças estatísticas expressas por * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001); **** (p < 0,0001).

4.7 O bloqueio do receptor MAS potencializa a expressão gênica de IL-1 β e IL-8 induzida pela Sp e Ang II

A fim de avaliar a participação dos receptores AT1 e MAS do SRA na modulação da expressão e secreção das citocinas pró-inflamatória IL-1 β e IL-8, foram conduzidos experimentos utilizando o pré-tratamento dos grupos experimentais com

LOS ou A-779, antagonista dos receptores AT1 e MAS respectivamente, cujos resultados estão representados na Figura 13.

Observou-se que a expressão do mRNA de IL-1 β aumentou de modo estatisticamente significativo no grupo estimulado com Sp em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) no período avaliado de 3h (Figura13-A), esse aumento foi acentuado pelo pré-tratamento com A-779, reforçando a hipótese de que MASR possui efeitos protetores anti-inflamatórios no contexto da infecção por SARS-CoV-2, essa expressão não foi alterado estatisticamente pelo pré-tratamento com LOS, mas foi observado uma tendência a redução, sugerimos então, que Sp pode aumentar a expressão da citocina por outras vias que não do AT1R. O estímulo com Ang II ou a sensibilização das células por Ang II 1h antes da estimulação por Sp não resultou em alterações significativas na expressão de IL-1 β no período de 3h, no entanto, o uso do A-779 aumentou a expressão de IL-1 β nesses grupos ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$ respectivamente) e, LOS aumentou a expressão comparada ao grupo estimulado apenas com Ang II ($p < 0,01$) (Figura13-A). Além disso o grupo pré-tratado com A-779, sensibilizado com Ang II 1h antes da estimulação por Sp mostrou uma regulação negativa na expressão de IL-1 β em comparação ao grupo A-779 + Sp ($p < 0,01$) (Figura13-A).

Após 12h de estímulo, o aumento na expressão de mRNA de IL-1 β induzida pela Sp foi ainda mais abundante ($p < 0,0001$) (Figura13-B). O uso do pré-tratamento com LOS ($p < 0,0001$), e A-779 ($p < 0,0001$) e da sensibilização com Ang II 1h antes da estimulação com Sp ($p < 0,0001$) reduziu significativamente a expressão de IL-1 β comparado ao grupo Sp. Concluímos que Sp pode estar estimulando o receptor AT1 para induzir a expressão da citocina inflamatória IL-1 β nas BMSCs. O uso de A-779 combinado com a sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp promoveu aumento significativo na expressão de IL-1 β em comparação ao grupo A-779 + Sp ($p < 0,0001$) (Figura13-B). Esses dados sugerem que a presença de Ang II e o bloqueio do receptor MAS desenvolvem um processo inflamatório mais exagerado nas células quando a longo prazo. A estimulação das células com Ang II no período de 12 h resultou em níveis elevados de expressão comparado ao grupo controle, que foi inibido pela ação do tratamento com LOS, mas não por A-779 ($p < 0,05$). Sugerindo, que Ang II induz a expressão de IL-1 β via ativação do receptor AT1 após um período maior de exposição (Figura13-B).

Com relação a expressão de IL-8 observamos que a estimulação das BSMC pela Sp mostrou um aumento significativo comparado ao grupo controle após 3h ($p < 0,01$) e essa expressão foi ainda maior no período de 12h ($p < 0,0001$), porém, foi inibida pelo pré-tratamento com LOS (Figura 13-C e D), sugerindo que Sp aumenta a expressão de IL-8 através da ativação do receptor AT1. O pré-tratamento com A-779, causou um aumento exacerbado na expressão de IL-8 induzida pela Sp no período de 3h ($p < 0,0001$), esse aumento foi inibido no grupo que foi sensibilizado por Ang II 1h antes da estimulação por Sp ($p < 0,0001$), com isso, concluímos que Ang II modula negativamente o efeito observado pela Sp, além de mostrar novamente o papel protetor do MASR no processo inflamatório desencadeado pela Sp. A sensibilização das células com Ang II 1h antes da Sp não apresentou mudanças na expressão de IL-8 comparada ao grupo Sp apenas, porém o pré-tratamento desse grupo com LOS e A-779 aumentou essa expressão. A Ang II não foi capaz de induzir expressão de IL-8 às 3h comparado ao grupo controle, no entanto, quando as células foram pré-tratadas por LOS ou A779 observamos um aumento da expressão de IL-8 nesse período (Figura 13-C). Quanto ao período de 12h, observamos que a expressão de IL-8 induzida pela estimulação da Sp foi inibida pelo LOS e também pelo A779. A estimulação das BSMC com Ang II induziu aumento da expressão de IL-8 após 12h ($p < 0,001$) que foi inibida pelo pré-tratamento com LOS ($p < 0,01$), mas não por A779. Reforçando a hipótese de que, em exposição prolongada, a Ang II pode exercer seus efeitos predominantemente por meio da ativação do receptor AT1, contribuindo para o aumento da expressão de citocinas inflamatórias. A sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp também reduziu a expressão de IL-8, mas o pré-tratamento com LOS ou A-779 não alterou essa expressão.

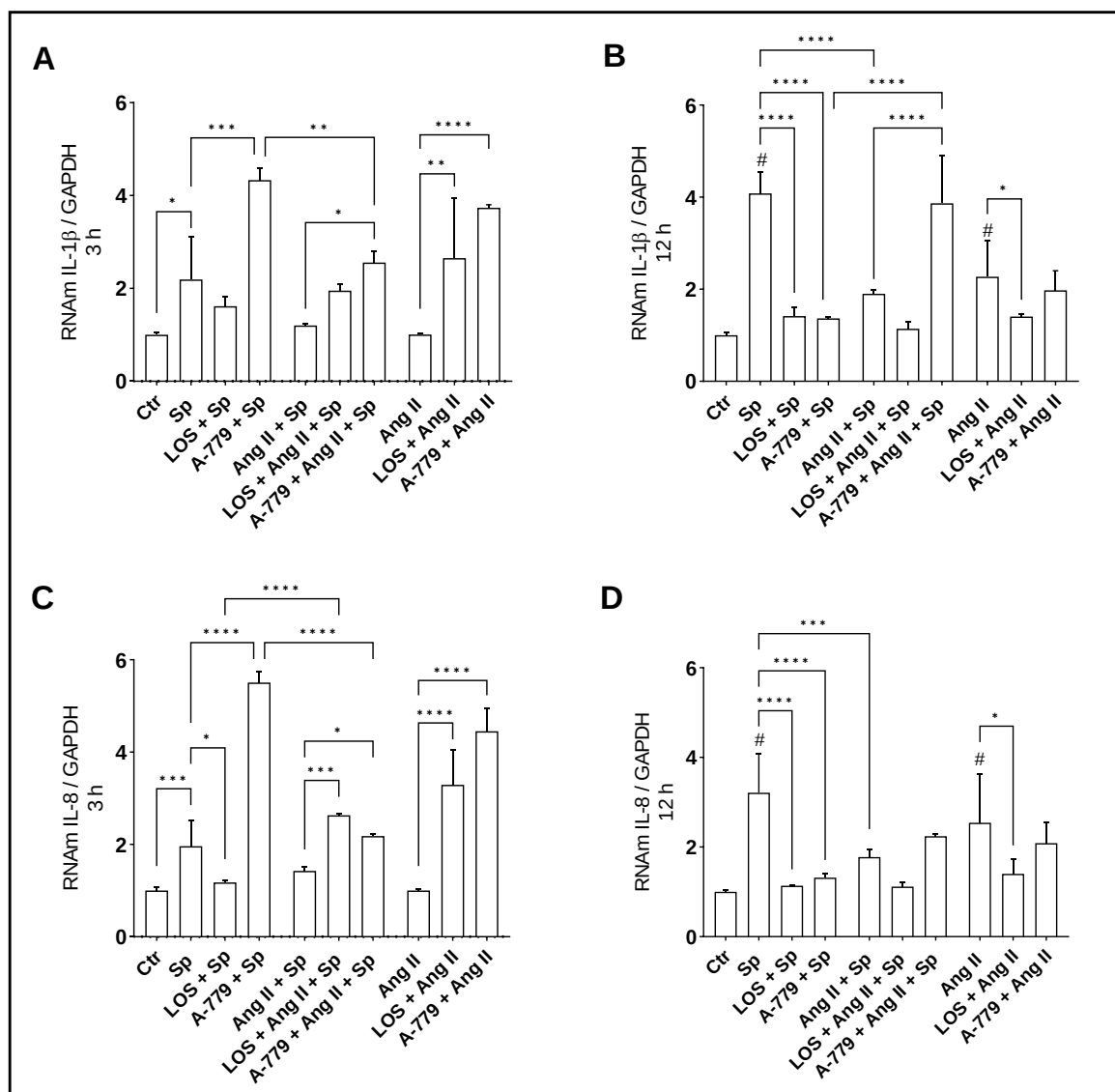


Figura 13. Expressão gênica das citocinas inflamatória IL-1 β e IL-8. Ensaio de tratamento com os antagonistas dos receptores AT1 e MAS. As células foram estimuladas com a Sp [100 ng/mL] ou com Ang II, ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp, com ou sem o pré-tratamento com LOS e A-779. Análise da expressão relativa dos genes IL-1 β (A e B) e IL-8 (C e D) após 3 horas (A e C) e 12 horas (B e D) de incubação foi quantificada por RT-qPCR, utilizando o gene GAPDH como controle endógeno. As barras estão expressas como média $\pm$ desvio padrão da média de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA, seguida do teste de Sidák e expressas por * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # = diferença significativa em relação ao grupo controle.

4.8 A proteína Spike recombinante do SARS-CoV-2 aumenta a produção proteica de IL-1 β e IL-8

Afim de correlacionar a produção proteica de IL-1 β e IL-8 com a expressão gênica, foram realizados ensaios de ELISA utilizando o sobrenadante coletado das células estimuladas com Sp e Ang II, bem como, com pré-tratamento com LOS e A-779. Os resultados estão expressos na Figura 14.

Observou-se que o estímulo com a Sp aumentou a produção de IL-1 β induzida após o período avaliado de 3h ($p < 0,0001$) (Figura 14-A), esse aumento foi revertido pelo pré-tratamento com LOS ($p < 0,0001$). O pré-tratamento com A-779 aumentou novamente os níveis de IL-1 β em relação ao grupo tratado com LOS, ainda assim, observamos uma diminuição significativa em relação ao grupo Sp ($p < 0,001$). O estímulo com Ang II aumentou a liberação de IL-1 β ($\# = p < 0,01$) comparado ao grupo controle, no entanto, a sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp reduziu a produção de IL-1 β induzida por Sp isoladamente ($p < 0,05$), essa redução foi acentuada com o pré-tratamento com LOS ($p < 0,0001$).

Após 12h de estimulação das BSMC (painel B), Sp elevou os níveis de IL-1 β ($p < 0,001$), que foi reduzida pelo pré-tratamento com LOS ($p < 0,01$) e A-779 ($p < 0,05$). No grupo estimulado com Ang II isoladamente não houve diferença na liberação de IL-1 β pelas BSMC em relação ao grupo controle. A sensibilização com Ang II 1h antes da estimulação com Sp diminuiu os níveis de IL-1 β em comparação ao grupo Sp ($p < 0,01$). O pré-tratamento com A-779 nas células sensibilizadas com Ang II 1h antes da estimulação com Sp reduziu nos níveis de IL-1 β nos sobrenadantes em comparação ao grupo Ang II + Sp ($p < 0,01$) e A-779 + Sp ($p < 0,001$).

Avaliamos também a produção e liberação de IL-8 pelas BSMC nos períodos de 3 horas (painel C) e 12 horas (painel D). Observamos que o estímulo com Sp apresentou aumento significativo nos níveis de IL-8 comparado ao grupo controle no período avaliado de 3h ($p < 0,001$) (Figura 14-C), no entanto, esse aumento foi inibido com o pré-tratamento com LOS ($p < 0,01$), mas não com A-779. O estímulo com Ang II reduziu os níveis de IL-8 nesse período ($p < 0,001$). A sensibilização das BSMC com Ang II 1h antes do estímulo com Sp mostrou pequena diferença nos níveis de IL-8 em comparação ao grupo Sp ($p < 0,05$), porém, o pré-tratamento com LOS acentuou a diminuição dos níveis de IL-8 ($p < 0,01$). O uso de A-779 combinado com a sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp promoveu redução significativa na produção de IL-8 comparado ao seu respectivo grupo controle A-779 + Sp ($p < 0,0001$).

No período de 12h, Sp aumentou a liberação de IL-8, que foi revertida com o tratamento com LOS e A-779 ($p < 0,0001$). O estímulo com Ang II mostrou um pequeno aumento nos níveis de IL-8 ($p < 0,01$). A sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp diminuiu os níveis de IL-8 comparado ao grupo Sp ($p < 0,0001$), essa redução foi revertida pelo tratamento com LOS, mas não pelo A-779. A

sensibilização por Ang II 1h antes da estimulação por Sp combinados com o pré-tratamento com LOS e A-779 modulou negativamente a produção de IL-8 comparado ao grupo LOS + Sp e A-779 + Sp respectivamente ($p < 0,0001$).

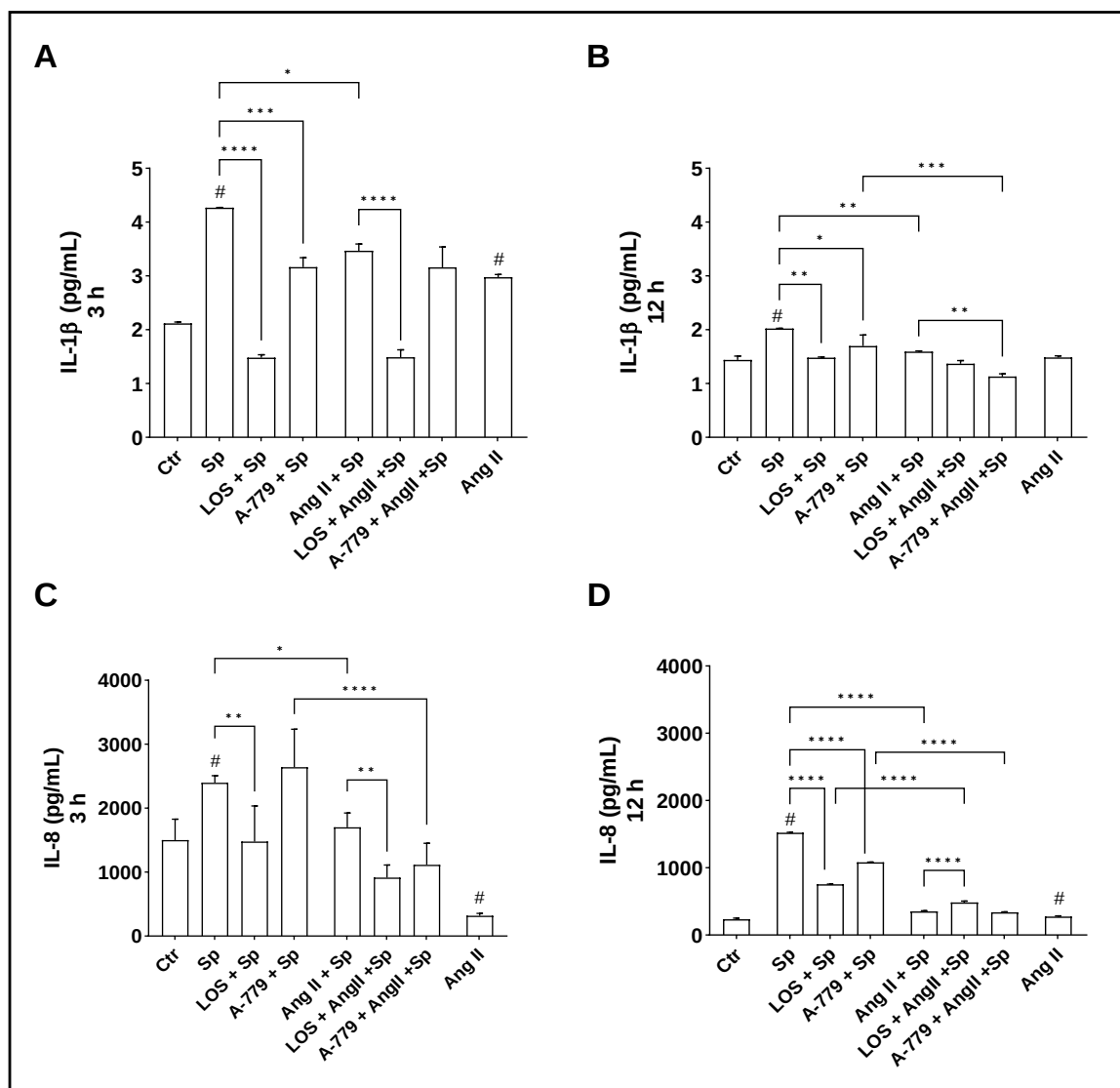


Figura14. Dosagem de produção e liberação de IL-1β e IL-8 com o pré-tratamento com LOS e A-779 combinado com Sp ou Ang II por ELISA. As BSMCs foram estimuladas com Sp (100 ng/mL) ou Ang II (100 ng/mL) ou sensibilizadas com Ang II 1h antes do estímulo com Sp na presença ou ausência do pré-tratamento com LOS ou A-779, por 3 horas (A, C) e 12 horas (B, D). A expressão das citocinas IL-1β (A, B) e IL-8 (C, D) foram quantificadas por ELISA. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média ($n = 3$). Diferenças estatísticas expressas por * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # = diferença significativa em relação ao grupo controle.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a proteína Spike recombinante do SARS-CoV-2 e a Ang II induzem a expressão de componentes do SRA e a liberação de citocinas inflamatórias em células musculares lisas brônquicas humanas. Além disso, mostramos que a Ang II é capaz de modular a resposta induzida pela Sp envolvendo a ativação dos receptores AT1 e MAS. Utilizamos o antagonista do receptor AT1, losartana e o antagonista experimental do receptor MAS, A-779 para compreender a ativação dessas vias sobre a expressão do ECA2, AT1R e MASR. Revelamos que essas respostas podem desencadear um processo inflamatório nas BSMCs, evidenciado pela expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8 que são moduladas por AT1R e MASR.

A musculatura lisa brônquica desempenha um papel importante na regulação do tônus basal e da distribuição da ventilação dos brônquios, ajustando a resistência local ao fluxo de ar⁶⁷. A relação entre o aumento da área da musculatura lisa ao redor das vias aéreas de grande e pequeno porte, a gravidade clínica e a duração das doenças respiratórias, aquelas desenvolvidas na COVID-19, está bem estabelecida^{68,69}. Estudos recentes destacaram o papel fundamental das células das vias aéreas na infecção pelo SARS-CoV-2, bem como o envolvimento do SRA como vias de sinalização potencialmente ativadas para desencadear cascatas inflamatórias^{9,14,70}. A capacidade das BSMCs de responder a estímulos virais já foi demonstrada, confirmando a importância dessas células nas vias aéreas^{71,72}. No entanto, a participação específica das BSMCs no contexto da infecção pelo vírus da COVID-19 permanece pouco explorada. Dessa forma, a ativação tanto da via clássica pró-inflamatória (ECA/Ang II/AT1R) quanto da via não inflamatória (ECA2/Ang(1-7)/MASR) do SRA em BSMCs necessita de investigação adicional. Assim, o presente estudo é pioneiro ao investigar a ativação dessas vias nesse tipo celular no contexto da infecção pelo SARS-CoV-2, demonstrando a capacidade dessas células responderem à estimulação pela Sp por meio da expressão dos componentes do SRA e da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8.

Estudos relataram aumento da pressão hidrostática e da permeabilidade vascular em pacientes com COVID-19, destacando o complexo Ang II/AT1R como um dos principais contribuintes para lesão pulmonar grave durante a infecção por SARS-CoV-2^{71,73}. Está bem descrito que o receptor AT1 é ativado quando ocorre a ligação

com a Ang II. Além do efeito vasoconstritor direto, a Ang II promove hipertrofia e remodelamento nas células musculares lisas, contribuindo para processos inflamatórios e fibrogênicos⁷⁴. Isso nos levou a avaliar a ação da Sp e a modulação da Ang II sobre o efeito da Sp na expressão gênica do receptor AT1 do SRA em BSMCs. Observamos que a expressão do AT1R foi significativamente aumentada nas BSMCs estimuladas por Sp ou Ang II, sugerindo que, neste modelo experimental *in vitro*, ambas as moléculas – Sp e Ang II – podem contribuir para a ativação da via inflamatória do SRA, possivelmente por meio do aumento da disponibilidade de Ang II que se liga e ativa AT1R. A elevação da expressão do AT1R reforça a hipótese de que a ligação de Ang II a este receptor está ocorrendo de forma funcional, promovendo a sinalização pró-inflamatória típica do eixo ECA/Ang II/AT1R nesse tipo celular. Além disso, o fato de a Sp também induzir esse efeito reforça a hipótese de que a interação entre a proteína viral e as células das vias aéreas pode acionar mecanismos pró-inflamatórios mediados por receptores do SRA⁷⁴. A partir dos nossos resultados, sugerimos que as BSMCs podem estar aumentando e liberando Ang II a partir do estímulo com Sp, além disso confirmam a capacidade da Sp desencadear respostas inflamatória em células *in vitro* e sugere uma interação entre os mecanismos inflamatórios mediados pelo SARS-CoV-2 e os componentes do SRA⁷⁵. Esses dados contribuem para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na inflamação das vias aéreas durante a COVID-19. Um ponto importante observado foi o aumento considerável da expressão do AT1R induzido pela Sp depois da sensibilização prévia com Ang II após o período avaliado de 24h, mostrando que a Ang II pode potencializar a expressão do AT1R no contexto da infecção por Sp. Esse resultado sugere que a exposição prolongada à Ang II pode intensificar o processo inflamatório induzido pela Sp a longo prazo⁷⁶.

A ativação do AT1R em resposta ao SARS-CoV-2 tem sido proposta como um dos principais mecanismos envolvidos nas complicações pulmonares observadas em pacientes com COVID-19, especialmente na progressão para quadros de pneumonite grave e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), uma vez que a ativação do AT1R está relacionada a um cenário pró-inflamatório, o qual pode contribuir para a piora do quadro infeccioso^{74,77}. Dessa forma, a modulação da via Ang II/AT1R torna-se uma estratégia promissora para mitigar os efeitos adversos da infecção viral nas vias respiratórias⁷⁸.

O uso de antagonistas do receptor AT1 tem sido sugerido como uma potencial estratégia terapêutica. Acredita-se que, ao bloquear o receptor AT1, os efeitos mediados pela Ang II possam ser reduzidos, atenuando a resposta inflamatória exacerbada e protegendo o tecido pulmonar contra possíveis lesões. Estudos demonstraram que o losartana minimiza o risco de mortalidade em pacientes hipertensos infectados pelo SARS-CoV-2⁷⁹. Por outro lado, estudos randomizados mostraram que esses bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRAs), não apresentaram melhora significativa nos desfechos clínicos de pacientes sem comorbidades^{37,80}.

Considerando que a Sp e Ang II são capazes de estimular a expressão de AT1R nas BSMCs, o próximo passo foi investigar o efeito dos antagonistas dos receptores AT1 e MAS sobre essa expressão. Os resultados obtidos indicam que a expressão do AT1R é, ao menos em parte, dependente da ativação dos próprios receptores AT1 e MAS. Isso se confirma, uma vez que os dados revelaram que o pré-tratamento das BSMCs com LOS e A-779 reduziu significativamente a expressão do AT1R induzida por Sp ou Ang II.

No caso da Ang II, é esperado que ela interage diretamente com AT1R, uma vez que Ang II é o ligante direto de AT1R e, portanto, promove sua ativação e autorregulação, favorecendo o aumento da expressão gênica desse receptor. Enquanto a Sp, sugere-se que o aumento da expressão do AT1R possa estar relacionado a uma maior liberação de Ang II pelas BSMCs em resposta ao estímulo viral, resultando em ativação indireta do AT1R. Adicionalmente, o efeito observado pelo A-779 indica que o aumento na expressão do AT1R nas BSMCs quando exposto a Sp ou Ang II também pode depender da ativação do receptor MAS. Assim, propõe-se que a elevação do AT1R nas BSMCs, quando expostas a Sp ou Ang II, possa ocorrer por mecanismos interdependentes envolvendo tanto o receptor AT1 quanto o receptor MAS, evidenciando uma complexa interação entre as vias clássica e alternativa do SRA no contexto da inflamação induzida pelo SARS-CoV-2. Em seu estudo, Canals (2006) demonstrou que os receptores AT1 e MAS são frequentemente coexpressos, por exemplo, em células musculares lisas vasculares⁸¹. Foi demonstrado que a indução da expressão do MASR pode levar à regulação positiva do AT1R. Concluiu-se, portanto, que a atividade constitutiva do MASR também pode ser responsável pela regulação positiva do AT1R. Essa conclusão foi confirmada por uma série de estudos conduzidos por Jun Takasaki et al. (2004)^{81,82}. Outros estudos

indicaram que o MASR, quando coexpresso com o AT1R, atenua o acoplamento do AT1R à proteína G mediado por Ang II, ao mesmo tempo que aumenta a expressão do AT1R, indicando que esses dois receptores podem formar dímeros e interagir funcionalmente⁸³. Reforçando nossos achados, as BSMCs pré-tratadas com o antagonista do MASR, A-779, revelaram uma redução na expressão do AT1R, destacando a forte relação entre a expressão do AT1R e do MASR. Dessa forma, serão necessários mais estudos para compreender melhor o papel dos antagonistas, principalmente do A-779, que ainda é usado apenas experimentalmente, na evolução clínica de pacientes com COVID-19.

Nossos dados mostram que as BSMCs estimuladas com Sp ou Ang II aumentaram também a expressão de ECA2 após 3h da estimulação. Sabe-se que a ECA2 é o principal receptor de entrada do SARS-CoV-2 na superfície celular, e que o nível de expressão dessa enzima é um fator determinante para a infecção viral^{13,15}. Como mencionado anteriormente, a ECA2 desempenha um papel central no equilíbrio entre as vias inflamatória e anti-inflamatória do SRA. Vale destacar que a ECA2 existe em duas isoformas: uma forma solúvel circulante, que participa do SRA sistêmico, e uma forma ligada à membrana, que integra o SRA local⁸⁴. Estudos afirmaram que ocorre a internalização e perda de função da ECA2 ligada a membrana após a infecção pelo SARS-CoV-2, por outro lado, Sp pode desencadear sinalizações que modulam a expressão de ECA2 solúvel internamente⁸⁵. A expressão de ECA2 em BSMCs ainda não foi relatada; no entanto, já foi observada em células musculares lisas vasculares pulmonares, especialmente em células musculares arteriais^{84,86}. Corroborando nossos dados, estudos conduzidos por Zhou et al. demonstraram que a Sp é capaz de induzir a expressão de ECA2 em células epiteliais brônquicas e sugeriram ocorrer por meio da ativação das vias sinalizadoras associadas a interferons, para promover essa indução¹⁴. Outros trabalhos relataram que os níveis de expressão de ECA2 são regulados positivamente pela infecção de diversos vírus, incluindo o SARS-CoV-1 e o MERS-CoV, vírus semelhante ao do COVID-19 o SARS-CoV-2^{21,24}. Nesses estudos sugeriram que a Sp possivelmente libera citocinas que estimulam as vias das STATs e aumentam a ECA2. No entanto, esse mecanismo precisa ser investigado em nosso modelo experimental. Além disso, o efeito observado pela estimulação com Ang II sugere a existência de um mecanismo autorregulatório do SRA nesse tipo celular. Corroborando essa hipótese, em estudos in vitro, Caputo et al. demonstraram que a Ang II pode aumentar a expressão do

mRNA de ECA2 via ativação do receptor AT1 em células epiteliais brônquicas humanas^{71,86}. Este mesmo mecanismo pode estar presente nas BSMCs, sugerido pelo aumento concomitante da expressão de AT1R induzido pela Ang II observado neste trabalho.

Afim de reforçar essas hipóteses e entender quais os mecanismos do SRA envolvidos no aumento da ECA2 induzido pela Sp e Ang II, tratamos as células com LOS e A-779 e avaliamos a expressão de ECA2 novamente. Vimos que Sp ou Ang II aumentam a expressão de ECA2 nas BSMCs independentemente da ativação do AT1R e do MASR, mas esse aumento é ainda mais pronunciado quando o MASR é bloqueado pelo uso do A-779. Sugerimos então, um potencial mecanismo de feedback compensatório, visto que não tendo ativação de MASR, a produção aumentada de ECA2 tenta equilibrar o eixo ECA2/Ang1-7/MASR, favorecendo a produção de Ang 1-7, responsável pelos efeitos anti-inflamatórios do SRA.

Estudos anteriores, relatam que essa regulação positiva de ECA2 possivelmente pode estar ocorrendo por meio da sinalização do receptor AT2 para neutralizar a superativação de Ang II/AT1R induzida por Sp ou uma via de sinalização inflamatória⁸⁷. Estudos conduzidos por Jinghua Lu e Peter D. Sun relataram que a ligação de Sp à ECA2 pode desencadear respostas celulares que modulam a expressão desse receptor, eles demonstraram que Sp pode aumentar a atividade proteolítica da ECA2, potencialmente influenciando sua expressão e função. Além disso, a ativação de receptores como o TLR4 por Sp pode produzir citocinas pró-inflamatórias e modulação da expressão gênica relacionada à resposta imune, incluindo a ECA2⁸⁵. Esses mecanismos sugerem que Sp pode influenciar a expressão de ECA2 diretamente por meio de sua interação com o receptor e indiretamente pela ativação de vias de sinalização inflamatória^{88,89}. Além disso, de acordo com nossos dados, sugerimos que a estimulação ou a sensibilização prévia das células com Ang II pode causar maior ativação da via AT1R, potencializando a ativação dessas vias inflamatórias associadas ao aumento da ECA2. Também foi relatado anteriormente que o tratamento com antagonistas dos receptores de Ang II pode aumentar a expressão de ECA2 em tecidos. Além disso, evidências relatam que a atividade da ECA2 inibe lesão pulmonar aguda por meio da formação de Ang (1-7)^{32,77,90}. Reforçando a hipótese sugerida, é possível que as BSMCs, após tratamento com o A-779, aumentem a expressão de ECA2 e, conseqüentemente essa enzima estimula a produção de Ang 1-7, na tentativa de restaurar o equilíbrio do SRA, possivelmente por

meio de um mecanismo compensatório ativado pela inibição do eixo anti-inflamatório ECA2/Ang-(1-7)/MASR. Adicionalmente, estudos clínicos e experimentais têm sugerido que condições como o diabetes mellitus, associadas ao aumento da expressão de ECA2 nas vias aéreas, podem contribuir para a maior gravidade da COVID-19 nesses pacientes^{91,92}. Assim, a observação de que tanto a Sp quanto a Ang II são capazes de induzir a expressão de ECA2 em BSMCs reforça a relevância dessas células na resposta imunológica das vias aéreas frente à infecção viral^{93,94}.

Durante a infecção aguda, a ligação da Sp ao receptor ACE2 promove a sua internalização e/ou clivagem pela ADAM-17, reduzindo a ACE2 de membrana e amplificando o braço pró-inflamatório ACE/Ang II/AT1R. Evidências de pacientes acompanhadas por até oito meses mostram que essa perturbação persiste em muitos convalescentes, no entanto, a atividade de ACE2 solúvel permanece elevada e há indícios de acúmulo de Ang II na circulação, caracterizando um cenário que favorece vasoconstrição, estresse oxidativo, fibroso, favorecendo dano tecidual^{95,96}.

Investigamos também os níveis de proteína de ECA2 nas BSMCs tratadas com os antagonistas e estimuladas com Sp e Ang II. Observamos aumento de ECA2 após a estimulação por Sp, porém o pré-tratamento com LOS inibiu esse aumento, sugerindo que a elevação dos níveis de ECA2 depende da ativação do AT1R. Esse dado reforça a hipótese de que Sp possivelmente induz um aumento nos níveis de Ang II nas BSMCs que ativa seu receptor AT1 para aumentar os níveis de ECA2, assim como discutido por Caputo et al.⁷². A pré-sensibilização das BSMCs com Ang II no grupo que recebeu pré-tratamento com LOS volta a aumentar os níveis de ECA2, confirmando novamente essa hipótese. Ao analisar o efeito modulatório da Ang II sobre os efeitos da Sp, nossos resultados mostraram que a Ang II foi capaz de modular tanto a expressão gênica quanto a produção proteica de ECA2 de forma distinta. É possível que, considerando que a análise da expressão do mRNA e da produção da proteína de ACE2 foi realizada após 3h de estimulação, tenha havido uma janela de tempo relativamente curta, o que pode não ter sido suficiente para que a produção proteica atingisse seu pico máximo.

Ao avaliar a expressão do receptor MAS, observamos um aumento significativo dessa expressão induzida pela Sp nas BSMCs, detectada nas primeiras 3h após a estimulação, mantendo-se moderadamente elevada até 24h. Esses dados sugerem que o receptor MAS pode estar envolvido no processo de infecção dessas células pela Sp em condições *in vitro*, podendo atuar como um regulador negativo dos efeitos

prejudiciais causados pelo SARS-CoV-2. Assim como sugere a literatura, o aumento da expressão do MASR pela Sp pode indicar sua participação na mitigação da inflamação e na restauração da homeostase celular após a ação da Sp⁹⁷. Além disso, Ang II também foi capaz de aumentar a expressão do receptor MAS, presumimos que a Ang II inicialmente atua por meio da ativação do seu receptor AT1R, assim, induzindo o aumento na expressão de ECA2, favorecendo a conversão de Ang II em Ang (1-7) nas BSMCs, promovendo, consequentemente, a ativação do receptor MAS nas BSMCs. Tal mecanismo sugere a existência de um processo de autorregulação celular frente à infecção *in vitro*, mediado pela ativação compensatória do eixo ECA2/Ang (1-7)/MASR, com o objetivo de restabelecer o equilíbrio do SRA. Estudos futuros devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese, como a quantificação direta do peptídeo Ang (1-7). Além disso, esse dado reforça a hipótese de que o aumento da expressão do MASR aumenta também a expressão de AT1R pela interação desses dois receptores na formação de dímeros⁸³. Porém, esse aumento na expressão do MASR foi inibido quando tratamos as células com A-779 e também com LOS. O efeito observado no grupo tratado com A-779, sugere que a expressão do MASR depende da sua ativação, possivelmente através da ligação com seu ligante Ang (1-7) no contexto da infecção por SARS-CoV-2. O uso do A-779 também inibiu a expressão do MASR induzido pela Ang II após 12 horas, porém, esse antagonista não alterou a expressão do MASR induzida por Ang II após 3 horas. Isso nos leva a pensar que os mecanismos envolvidos na expressão do MASR pela Ang II emergem principalmente em fases mais tardias da infecção. Sugere-se que o aumento da expressão do receptor MAS esteja associado à elevação nos níveis de ECA2 como observado neste estudo, a qual pode ter sido induzida pela ativação do receptor AT1R mediada pela ligação da Ang II, favorecendo assim, uma maior produção de Ang (1-7), ligante específico do receptor MAS, pela ação da ECA2. Dessa forma, o eixo ECA2/Ang (1-7)/MAS emergiu como um importante mediador das complicações pós-COVID-19 devido ao seu papel protetor contra a piora de lesões pulmonares e cardíacas desenvolvidas na SARS^{97,98}. Já ao pré-tratamento das BSMCs com LOS, observamos uma inibição da expressão do MASR em células estimuladas com Sp e também com Ang II após 12h. Assim, sugerimos que, o aumento da expressão do MASR, é dependente da ativação do AT1R nas BSMCs quando estimulada pela Sp e também quando exposta a Ang II por mais tempo. Estudos citados anteriormente sustentam a hipótese de que AT1R e MASR interagem diretamente, o que pode alterar

a expressão e funcionalidade desses receptores^{83,99,100}. A nível molecular, o SRA está fortemente envolvido na patogênese desta doença, assim como na fase aguda da infecção viral.

Está bem descrito que a Ang (1-7) se liga ao receptor MAS e exerce efeitos contrarregulatórios sobre a Ang II, bloqueando seus efeitos deletérios, como a inflamação e o dano tecidual mediados pelo receptor AT1, o que sugere que a ativação do receptor MAS desempenha um papel anti-inflamatório importante quadros inflamatórios^{101,102}. Embora, os papéis fisiológicos do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MASR no pulmão ainda não sejam completamente compreendidos, evidências indicam que esse sistema exerce funções cruciais em processos fisiopatológicos pulmonares⁴⁰. Diversos estudos demonstraram que o peptídeo Ang (1-7) é capaz de reduzir a inflamação pulmonar, além de reduzir a fibrose e a hipertensão arterial pulmonar^{98,103,104}. O receptor MAS foi detectado tanto no epitélio quanto nas células do músculo liso brônquico, sugerindo que esses tecidos podem ser pontos-chave para a ação protetora e benéfica do Ang (1-7)^{105,106}, corroborando os dados de expressão gênica do receptor MAS nas BSMCs mostrados neste trabalho.

As propriedades anti-inflamatórias do Ang (1-7) foram descritas inicialmente por El-Hashim et al. em um modelo experimental de asma alérgica. Nesse estudo, os autores demonstraram que o tratamento com Ang (1-7) foi eficaz em inibir o aumento no número total de células inflamatórias, induzido por ovoalbumina, incluindo eosinófilos, linfócitos e neutrófilos. Além disso, foi observada uma redução significativa na inflamação perivascular e peribrônquica. Importante ressaltar que tais efeitos foram mediados por meio da ativação do receptor MAS e puderam ser bloqueados pela administração do antagonista A-779¹⁰⁵. Outros trabalhos revelaram que na asma crônica, Ang (1-7) promoveu a atenuação benéfica de três características principais dessa doença: inflamação pulmonar, remodelação das vias aéreas e hiperresponsividade¹⁰⁶. Tais estudos concluem que os mecanismos moleculares envolvidos nessas ações anti-inflamatórias mediada pelo receptor MAS incluem uma redução da sinalização relacionada ao NF- κ B, reduções do fator de crescimento transformador (TGF)- β e modulação de citocinas (reduzindo IL-6 e IL-1 β e aumentando IL-10)^{26,107,108}.

É conhecido que a Ang II exerce potente ação na sensibilização celular in vitro (dados não mostrados). Neste estudo, a pré-sensibilização com Ang II seguida da estimulação com a Sp manteve o aumento na expressão do MASR induzida

inicialmente por Sp 12h após o estímulo nas BSMCs. A sensibilização com Ang II pode provocar alterações em cascata nas células, incluindo a ativação do AT1R, conforme observado em nossos resultados. Essa pré-sensibilização pode resultar em ativação celular aumentada, maior produção de fatores inflamatórios e alterações na expressão gênica que favorecem um ambiente propício à remodelação vascular¹⁰⁹. Quando células previamente sensibilizadas pela Ang II são expostas a um estímulo viral, os efeitos da Ang II podem intensificar as respostas imunes ao vírus, como a causada pelo SARS-CoV-2, aumentando as complicações associadas a essas infecções^{73,74}. Embora os efeitos adversos da ativação do AT1R sejam bem documentados, há evidências de que o peptídeo Ang (1-7), produzido pela ação da ECA2 após exposição prévia à Ang II, pode oferecer um mecanismo protetor contra lesões vasculares associadas à sinalização exacerbada da Ang II¹⁰². Esses achados ressaltam a complexidade das interações entre os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) e suas implicações fisiopatológicas. É importante destacar que as células pulmonares estão expostas a altas concentrações de Ang II, uma vez que o endotélio vascular pulmonar é um local essencial para a conversão de Ang I em Ang II pela ECA⁷¹.

Concluimos que Sp ou Ang II podem estimular BSMCs humanas a expressar MASR, ECA2 e AT1R. Além disso, a expressão do MASR induzida por Sp depende da ligação ao seu ligante Ang (1-7) e, possivelmente, da ativação do receptor AT1 pela Ang II. Mais estudos devem ser conduzidos no futuro para compreender melhor esses mecanismos.

Uma das principais características clínicas da COVID-19 é o desenvolvimento da chamada “tempestade de citocinas”, um fenômeno que leva à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), coagulação intravascular disseminada e falência de múltiplos órgãos em pacientes com COVID-19 grave^{65,110}. Essas citocinas desempenham papéis fundamentais na fisiopatologia da COVID-19, estando associadas à severidade da doença, danos teciduais e complicações respiratórias. Uma das citocinas responsáveis por esse fenômeno é a IL-1 β , um marcador pró-inflamatório crucial¹¹¹, produzida principalmente por macrófagos, monócitos e células epiteliais em resposta à ativação de receptores do tipo Toll (TLR), em especial TLR9, mediador das infecções virais¹¹². A liberação de IL-1 β está associada ao aumento da permeabilidade vascular, febre, recrutamento de células imunes e amplificação da inflamação pulmonar¹¹³. Além da IL-1 β , a IL-8, uma quimiocina pró-inflamatória que

desempenha papel central na resposta imune inata, particularmente no recrutamento e ativação de neutrófilos, também tem sido associada à quadros graves de COVID-19. Ela é produzida por diversos tipos celulares, incluindo células epiteliais, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta a estímulos infecciosos como vírus e bactérias ou inflamatórios como TNF- α e IL-1 β ¹¹⁴. A síntese de IL-8 é estimulada pelas interleucinas IL-17A e IL-17F, secretadas por células Th17 dependentes de IL-6, que provavelmente estão envolvidas no desencadeamento da tempestade de citocinas em infecções graves por SARS-CoV-2^{115–117}. A IL-8 também é produzida em grandes quantidades pelo epitélio respiratório que exerce uma função crucial na resposta inflamatória durante a infecção por SARS-CoV-2¹¹⁸.

O presente estudo investigou a expressão de IL-1 β e IL-8 em BSMCs expostas à Sp e observamos um aumento significativo. Estudos confirmam que a Sp pode induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios *in vitro*, incluindo a IL-1 β e IL-8, por meio da ativação de diferentes vias inflamatórias, como o NF- κ B e os receptores TLR^{105,119}. A Sp do SARS-CoV-2 pode aumentar a expressão e produção de IL-1 β , através da ativação dessas vias que promove a clivagem da pró-IL-1 β em sua forma ativa via caspase-1¹¹². No entanto, nossos ensaios mostraram que, o pré-tratamento das células com LOS inibi a expressão e liberação dessas citocinas induzidas pela Sp, evidenciando o envolvimento do eixo clássico do SRA no processo inflamatório induzida pela Sp, sugerindo que ocorre a ativação do AT1R possivelmente pela ligação com Ang II, seu ligante, favorecendo a produção e liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-8 nas BSMCs, o que reforça a hipótese de que o receptor AT1 pode estar diretamente envolvido na mediação da inflamação relacionada a estas citocinas induzidas pelo SARS-CoV-2^{120,121}. Esse achado é consistente com estudos que propõem o uso de antagonistas do AT1R como estratégia terapêutica para limitar o dano inflamatório pulmonar na COVID-19¹²². De forma semelhante, estudos realizados em pacientes com COVID-19 demonstraram um aumento em diversas citocinas inflamatórias no plasma, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , contribuindo para uma resposta inflamatória exacerbada. Sabe-se que níveis elevados de IL-1 β e IL-8 estão correlacionados com a infecção por SARS-CoV-2^{120,123}. Corroborando nossos resultados, estudos *in vivo* demonstraram níveis elevados de IL-8 no fluido de lavagem nasal de pacientes com COVID-19, correlacionando-se com a gravidade dos sintomas durante a infecção do trato respiratório⁶². Por outro lado, o uso do A-779, antagonista do MASR, aumentou ainda mais a expressão das citocinas induzidas pela

Sp, especialmente no tempo de 3h, evidenciando que o eixo ECA2/Ang-(1–7)/MASR exerce uma função anti-inflamatória protetora¹²⁴. Os dados da inibição desse receptor parecem deslocar para o efeito da via pró-inflamatória mediada pelo AT1R, levando a maior produção de IL-1 β e IL-8. Isso demonstra a importância da atividade de ECA2 no equilíbrio do SRA e da ativação do MASR na contenção da inflamação, cujo comprometimento do exercício da ECA2 pelo SARS-CoV-2 resulta em desequilíbrio pró-inflamatório.

Já a estimulação das BSMCs com Ang II, na concentração utilizada, promoveu aumento na expressão de IL-1 β e IL-8 apenas após um período de 12h, sugerindo que a Ang II atua no desenvolvimento da inflamação de forma mais tardia em relação a Sp. Além disso, comprovamos que esse efeito foi mediado pela ativação do receptor AT1 após o pré-tratamento das células com LOS. A interação específica entre a ação da Ang II e a produção de citocinas nas BSMCs no contexto da COVID-19 ainda é pouco explorada na literatura. No entanto, já foi demonstrado que a Ang II pode induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação do AT1R, desencadeando respostas inflamatórias^{74,120,125}. Por outro lado, no período avaliado de 3h após estimulação, o tratamento com LOS aumentou a expressão IL-1 β e IL-8 induzida pela Ang II e de IL-8 induzida pela sensibilização por Ang II 1h antes da Sp, sugerindo que, possivelmente, nas primeiras horas da infecção, Ang II pode aumentar a expressão das citocinas independente da via AT1R. Foi sugerido que outros mecanismos inflamatórios podem estar envolvidos. Reforçando essa hipótese, estudo conduzido por Altmutlaq et al. demonstrou que células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) estimuladas com Ang II, Sp ou Ang II mais Sp apresentaram aumento significativo na produção de IL-1 β , indicando um potencial efeito sinérgico na indução de citocinas inflamatórias. Os autores sugerem que esse efeito pode estar associado à ativação exacerbada de células T auxiliares do subtipo Th17, conhecidas por sua forte atividade pró-inflamatória. Durante a infecção pelo SARS-CoV-2, acredita-se que a ativação desregulada das células Th17 contribua diretamente para a tempestade de citocinas, levando à produção excessiva de IL-17. Essa citocina, por sua vez, amplifica a liberação de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , culminando em danos teciduais, lesão pulmonar e edema alveolar grave¹²⁶. Embora as células Th1 e Th17 desempenhem papel fundamental na eliminação viral durante a resposta imune adaptativa, sua ativação excessiva, como a presença de altos níveis de Ang II, pode promover uma resposta inflamatória crônica,

perpetuando a liberação contínua de citocinas como IL-6 e IL-1 β ¹²⁶⁻¹²⁸. Esses achados destacam a conexão entre Ang II e IL-1 β em diferentes modelos inflamatórios. Outro estudo, conduzido por Alan CY Hsu demonstrou que a proteína S1 isolada do SARS-CoV-2 é capaz de induzir elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias. Os autores descrevem como possível via de inflamação na COVID-19, a ativação da via NF- κ B na infecção por SARS-CoV-2, representa um mecanismo molecular complexo e fundamental na resposta imune, caracterizado pela fosforilação da quinase I κ B (IKK), liberação subsequente do inibidor I κ B e translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo celular. Esse processo desencadeia uma cascata de eventos moleculares que culminam na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 β e, conseqüentemente, IL-8, amplificando de maneira significativa a resposta imune inata e contribuindo para a patogênese viral^{129,130}. Possivelmente a via de ativação do NF- κ B é utilizada pela Ang II para a produção de IL-1 β e IL-8 nas BSMCs. O excesso de Ang II via AT1R ativa NF- κ B, JAK/STAT-3 e p38 MAPK, sustentando a síntese de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Em pacientes sintomáticos, que persistiu por mais de 12 semanas, meta-análises indicam níveis de citocinas sérica persistentemente mais alta do que em indivíduos sem sintomas prolongados, embora menor que na fase aguda; já IL-1 β mantém-se discretamente elevada em subgrupos com fadiga e dor torácica⁹⁵.

Com base nos resultados apresentados, é possível sugerir que a Sp do SARS-CoV-2 promove uma resposta inflamatória significativa nas BSMCs, como evidenciado pelo aumento na expressão e liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8. Esses achados corroboram estudos anteriores que demonstram que a Sp atua como um importante indutor de inflamação nas vias respiratórias, responsável pela a tempestade de citocinas observada em pacientes com COVID-19 grave^{61,64,123}. O bloqueio dos receptores do SRA, com LOS e A-779, demonstraram modular de maneira distinta a expressão e a liberação das citocinas. A sensibilização das BSMCs com Ang II 1h antes da estimulação com Sp modulou negativamente a expressão e secreção dessas citocinas, sugerindo um possível efeito de ativação de mecanismos reguladores. No entanto, a diminuição proteica foi moderada no período avaliado de 3h. O efeito foi inibido pelo uso de antagonistas, principalmente LOS, indicando que a sinalização mediada por AT1R continua sendo um potencial eixo de controle inflamatório no contexto da infecção viral por SARS-CoV-2. Curiosamente, além do estímulo com Ang II isoladamente aumentar os níveis de IL-1 β e IL-8, também reforça

o papel dual da Ang II como um peptídeo com potenciais efeitos tanto inflamatórios quanto moduladores.

Vale ressaltar que grupos como idosos, pacientes com comorbidades (hipertensão, diabetes, obesidade) e indivíduos imunossuprimidos tendem a apresentar respostas desreguladas, com níveis mais altos de citocinas inflamatórias. Esses pacientes frequentemente exibem níveis elevados de IL-1 β e IL-8 no plasma e apresentam maior risco de progressão para formas graves da COVID-19. Um ponto a ser considerado é como os pacientes hipertensos que fazem uso de antagonistas dos componentes do SRA se comportam frente a uma infecção induzida pelo SARS-CoV-2 ou tardiamente após a infecção. Evidências sugerem que o uso contínuo de BRAs e iECAs não está associado a um aumento do risco de infecção pelo SARS-CoV-2, nem à piora dos desfechos clínicos. Pelo contrário, alguns estudos indicam um possível efeito protetor, atenuando a inflamação pulmonar e reduzindo a gravidade da doença em pacientes hospitalizados^{131–133}. Em modelos experimentais, os BRAs, como a losartana, demonstraram reduzir a infiltração de células inflamatórias, preservar a função pulmonar e mitigar a tempestade de citocinas⁷⁷. Assim, os dados disponíveis apoiam a continuidade do tratamento com antagonistas do SRA em pacientes hipertensos infectados com SARS-CoV-2, reforçando seu potencial papel terapêutico na modulação da resposta inflamatória exacerbada que caracteriza os casos graves de COVID-19.

Em conjunto, nossos resultados confirmam a capacidade das BSMCs de responder a Sp ou Ang II, reforçando a importância dessas células na resposta imune das vias aéreas. Nossos dados apontam para o papel fundamental do SRA, especialmente dos receptores AT1 e MAS, na regulação da resposta inflamatória induzida pela Sp do SARS-CoV-2. A modulação farmacológica dessas vias pode representar uma abordagem terapêutica relevante para mitigar a inflamação exacerbada nas vias aéreas, na COVID-19 grave.

A COVID-19 teve um impacto significativo na vida e na saúde das pessoas desde seu surgimento em 2019. COVID longa é um termo aplicado pela OMS para descrever uma variedade de sintomas persistentes após infecção aguda por SARS-CoV-2. Foi demonstrado que a COVID longa afeta várias pessoas infectadas pelo vírus, independentemente da gravidade aguda da doença. Os sintomas da COVID longa, consistem no conjunto de danos a vários órgãos e sistemas, como os sistemas respiratório. A COVID-longa é resultado, em partes, de um desequilíbrio prolongado

no SRA que mantém Ang II/AT1R dominante e gera um estado inflamatório crônico heterogêneo⁹⁶. Entender como IL-1 β , IL-6 e IL-8 se interligam a esse eixo é crucial para direcionar terapias capazes de reduzir sequelas cardiovasculares, pulmonares e neurocognitivas de longo prazo.

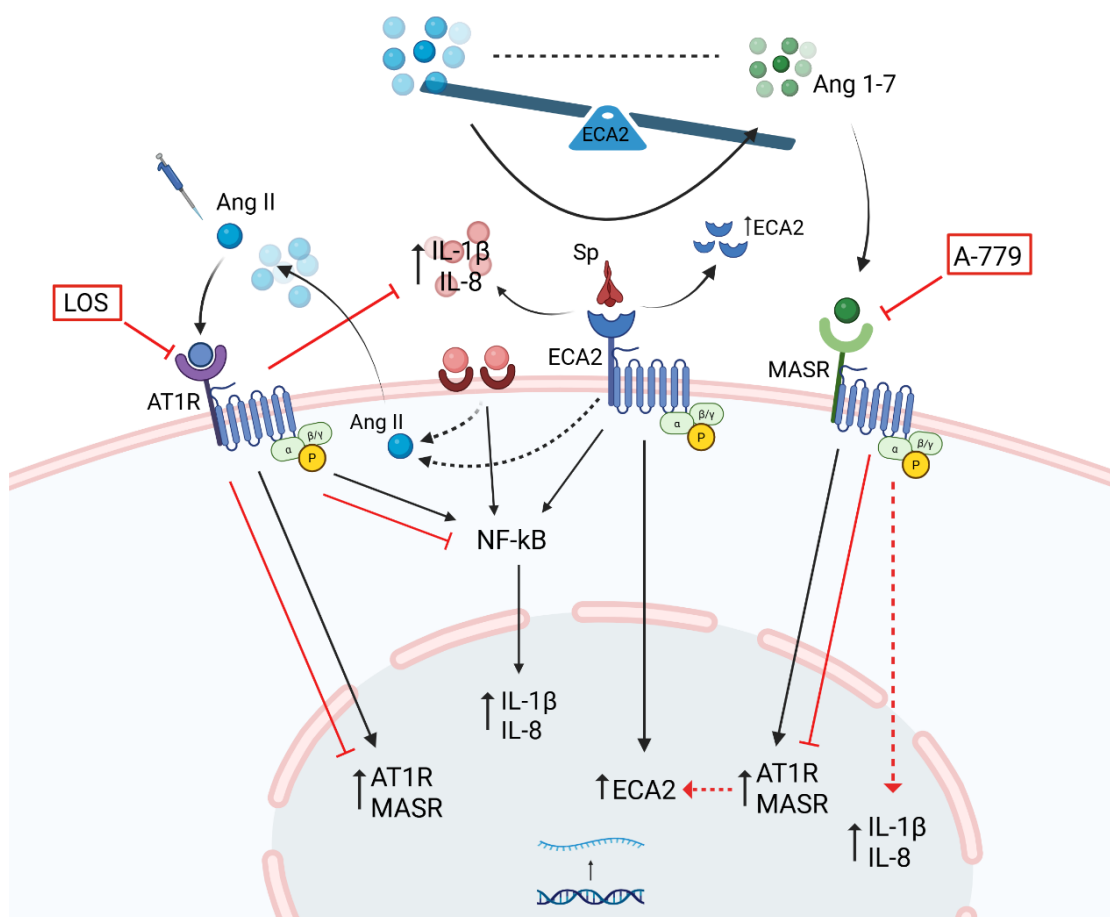


Figura15. Esquema representativo dos mecanismos de sinalização mediados pela Sp do SARS-CoV-2 e pela Ang II em BSMC encontrados no presente estudo, bem como os efeitos dos antagonistas LOS e A-779 nos componentes do SRA. A Sp do SARS-CoV-2 se liga ao receptor ECA2, desencadeando a ativação de vias inflamatórias intracelulares, incluindo a via do NF-κB, que leva ao aumento da expressão gênica e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8. Simultaneamente, essa interação induz a maior expressão dos receptores AT1R e MASR, através de uma maior produção de Ang II, além da própria ECA2. A interação da Sp com ACE2 induz uma maior produção e liberação de Ang II pela BSMC, o que leva a um excesso de Ang II no extracelular. A Ang II (exógena e endógena), ao se ligar ao receptor AT1R, também ativa a via do NF-κB, promovendo a expressão das citocinas que reforça o ciclo inflamatório. A ativação contínua de AT1R favorece o aumento de sua própria expressão e também do MASR, intensificando o desequilíbrio do SRA. Por outro lado, a via anti-inflamatória do SRA, mediada por ECA2, que converte a Ang II em excesso no peptídeo Ang-(1-7), e atua através do receptor MASR, promovendo efeitos anti-inflamatórios e reguladores, além de induzir também a maior expressão do AT1R e MASR. No entanto, o bloqueio desse receptor com seu antagonista A-779 inibe essa sinalização, levando ao aumento compensatório da expressão de ACE2, potencialmente como tentativa de restaurar o eixo protetor ACE2/Ang-(1-7)/MASR. Esse bloqueio também reduz a inibição da via pró-inflamatória, favorecendo a produção de IL-1 β e IL-8 (seta vermelha tracejada). O bloqueio do receptor AT1R com losartana (LOS) inibe a ativação do NF-κB e, conseqüentemente, reduz a expressão de IL-1 β e IL-8, além de impedir a retroalimentação positiva da expressão de AT1R e MASR (setas inibitórias vermelhas). No topo da figura, uma balança esquemática simboliza o equilíbrio dinâmico entre os eixos inflamatório (ACE/Ang II/AT1R) e anti-inflamatório (ACE2/Ang-(1-7)/MASR), destacando o papel crítico da ECA2 no controle da resposta inflamatória nas BSMCs durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a Sp e a Ang II são capazes de aumentar a expressão gênica de **ACE2**, **AT1R** e **MASR**, bem como a produção proteica de ACE2, além de induzir a expressão e a secreção das citocinas inflamatórias **IL-1 β** e **IL-8**. Esses efeitos são modulados e dependem da ativação dos receptores **AT1** e **MAS**, evidenciando a participação do SRA na mediação do processo inflamatório associado à COVID-19. Além disso, o contato prévio com **Ang II** modula a expressão dos AT1R e MASR, assim como a expressão e secreção das citocinas de maneira distinta, no geral, regulando negativamente o efeito da Sp.

Esses achados reforçam a importância em se ter um equilíbrio entre os eixos pró e anti-inflamatórios do SRA na regulação da inflamação nas vias aéreas durante a infecção viral, abrindo caminho para futuras investigações sobre intervenções terapêuticas voltadas ao controle da inflamação respiratória em pacientes com COVID-19 prolongada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Du Toit A. Outbreak of a novel coronavirus. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 123–123.
2. Hussain HY, Salim NA, Baderkhan B, et al. Trends of Mortalities and Morbidities due to COVID-19, from Explosiveness to Aggressiveness, Gaps in System Response, and Transmission Chain. *New Emirates Medical Journal* 2021; 2: 20–24.
3. Wu D, Wu T, Liu Q, et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis* 2020; 94: 44–48.
4. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497–506.
5. Li X, Geng M, Peng Y, et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2020; 10: 102–108.
6. Masters PS. The Molecular Biology of Coronaviruses. In: *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 193–292.
7. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020; 26: 450–452.
8. Kumar S, Maurya VK, Prasad AK, et al. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). *VirusDis* 2020; 31: 13–21.
9. Evans NJ, Schneider AC, Castro-Piedras I, et al. SARS-CoV-2 and HIV: Impact on Pulmonary Epithelial Cells. *Life (Basel)* 2022; 12: 1317.
10. Gibson PG, Qin L, Puah SH. COVID -19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre- COVID -19 ARDS. *Medical Journal of Australia* 2020; 213: 54.
11. Xie N-N, Zhang W-C, Chen J, et al. Clinical Characteristics, Diagnosis, and Therapeutics of COVID-19: A Review. *Curr Med Sci* 2023; 43: 1066–1074.
12. Global COVID-19 Overview | WHO COVID-19 dashboard. *datadot*, <https://data.who.int/dashboards/covid19/summary> (accessed 14 June 2025).
13. Wang Q, Zhang Y, Wu L, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* 2020; 181: 894-904.e9.
14. Zhou Y, Wang M, Li Y, et al. SARS-CoV-2 Spike protein enhances ACE2 expression via facilitating Interferon effects in bronchial epithelium. *Immunology Letters* 2021; 237: 33–41.
15. Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020; 117: 11727–11734.

16. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature* 2016; 531: 118–121.
17. Walls AC, Tortorici MA, Bosch B-J, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 2016; 531: 114–117.
18. Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022; 23: 3–20.
19. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 2016; 3: 237–261.
20. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021; 40: 905–919.
21. Verano-Braga T, Martins ALV, Motta-Santos D, et al. ACE2 in the renin–angiotensin system. *Clinical Science* 2020; 134: 3063–3078.
22. Khazaal S, Harb J, Rima M, et al. The Pathophysiology of Long COVID throughout the Renin-Angiotensin System. *Molecules* 2022; 27: 2903.
23. Coto E, Avanzas P, Gómez J. The Renin–Angiotensin–Aldosterone System and Coronavirus Disease 2019, https://www.eocrjournal.com/articles/renin-angiotensin-aldosterone-system-and-coronavirus-disease-2019?language_content_entity=en (2020, accessed 3 May 2025).
24. Jiang F, Yang J, Zhang Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1–7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11: 413–426.
25. Tseng Y, Yang R, Lu T. Two hits to the renin-angiotensin system may play a key role in severe COVID -19. *The Kaohsiung J of Med Scie* 2020; 36: 389–392.
26. Meng Y, Yu C-H, Li W, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas Axis Protects against Lung Fibrosis by Inhibiting the MAPK/NF-κB Pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50: 723–736.
27. Tan WSD, Liao W, Zhou S, et al. Targeting the renin–angiotensin system as novel therapeutic strategy for pulmonary diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 2018; 40: 9–17.
28. Jia H. Pulmonary Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) and Inflammatory Lung Disease. *Shock* 2016; 46: 239.
29. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Molecular Medicine* 2010; 2: 247–257.
30. Kim N, Jung Y, Nam M, et al. Angiotensin II affects inflammation mechanisms via AMPK-related signalling pathways in HL-1 atrial myocytes. *Sci Rep* 2017; 7: 10328.

31. Barhoumi T, Mansour FA, Jalouli M, et al. Angiotensin II modulates THP-1-like macrophage phenotype and inflammatory signatures via angiotensin II type 1 receptor. *Front Cardiovasc Med*; 10. Epub ahead of print 25 August 2023. DOI: 10.3389/fcvm.2023.1129704.
32. Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005; 436: 112–116.
33. Lanza K, Perez LG, Costa LB, et al. Covid-19: the renin–angiotensin system imbalance hypothesis. *Clinical Science* 2020; 134: 1259–1264.
34. Nazerian Y, Ghasemi M, Yassaghi Y, et al. Role of SARS-CoV-2-induced cytokine storm in multi-organ failure: Molecular pathways and potential therapeutic options. *Int Immunopharmacol* 2022; 113: 109428.
35. Zhang C, Wu Z, Li J-W, et al. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105954.
36. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* 2017; 39: 529–539.
37. Puskarich MA, Ingraham NE, Merck LH, et al. Efficacy of Losartan in Hospitalized Patients With COVID-19-Induced Lung Injury: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 2022; 5: e222735.
38. Mikusic NLR, Pineda AM, Gironacci MM. Angiotensin-(1-7) and Mas receptor in the brain. *Explor Med* 2021; 2: 268–293.
39. Li Y, Cao Y, Zeng Z, et al. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide–induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF–κB pathways. *Sci Rep* 2015; 5: 8209.
40. Kuriakose J, Montezano AC, Touyz RM. ACE2/Ang-(1-7)/Mas1 axis and the vascular system: vasoprotection to COVID-19-associated vascular disease. *Clinical Science* 2021; 135: 387–407.
41. Cohen JB, South AM, Shaltout HA, et al. Renin–angiotensin system blockade in the COVID-19 pandemic. *Clinical Kidney Journal* 2021; 14: i48–i59.
42. Majolo JH, Gonçalves JIB, Souza RP, et al. Losartan and enalapril maleate differently influence SARS-CoV-2-infected vero cells. *Sci Rep* 2024; 14: 24801.
43. Panettieri RA. Airway smooth muscle: An immunomodulatory cell. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002; 110: S269–S274.
44. Halayko AJ, Rector E, Stephens NL. Characterization of molecular determinants of smooth muscle cell heterogeneity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 917–929.

45. Halayko AJ, Tran T, Ji SY, et al. Airway Smooth Muscle Phenotype and Function: Interactions with Current Asthma Therapies. <http://www.eurekaselect.com>, <https://www.eurekaselect.com/article/904> (accessed 4 May 2025).
46. Ghaffar O, Hamid Q, Renzi PM, et al. Constitutive and Cytokine-Stimulated Expression of Eotaxin by Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1933–1942.
47. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497–506.
48. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, et al. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 53: 25–32.
49. Kadowaki M, Yamada H, Sato K, et al. Extracellular acidification-induced CXCL8 production through a proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells: a response inhibited by dexamethasone. *J Inflamm* 2019; 16: 4.
50. Potere N, Buono MGD, Caricchio R, et al. Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: Pathogenetic and therapeutic implications. *eBioMedicine*; 85. Epub ahead of print 1 November 2022. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104299.
51. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2020; 54: 62–75.
52. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal* 2022; 19: 92.
53. Declercq J, De Leeuw E, Lambrecht BN. Inflammasomes and IL-1 family cytokines in SARS-CoV-2 infection: from prognostic marker to therapeutic agent. *Cytokine* 2022; 157: 155934.
54. Angelis N, Porpodis K, Zarogoulidis P, et al. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Dis* 2014; 6: S167–S172.
55. Mahalingam SS, Jayaraman S, Arunkumar A, et al. Distinct SARS-CoV-2 specific NLRP3 and IL-1 β responses in T cells of aging patients during acute COVID-19 infection. *Front Immunol*; 14. Epub ahead of print 18 September 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1231087.
56. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev* 2009; 60: 57–64.
57. Wilson JG, Simpson LJ, Ferreira A-M, et al. Cytokine profile in plasma of severe COVID-19 does not differ from ARDS and sepsis. *JCI Insight*; 5: e140289.
58. Alonso-Domínguez J, Gallego-Rodríguez M, Martínez-Barros I, et al. High Levels of IL-1 β , TNF- α and MIP-1 α One Month after the Onset of the Acute

SARS-CoV-2 Infection, Predictors of Post COVID-19 in Hospitalized Patients. *Microorganisms* 2023; 11: 2396.

59. Lasola JJM, Kamdem H, McDaniel MW, et al. Biomaterial-Driven Immunomodulation: Cell Biology-Based Strategies to Mitigate Severe Inflammation and Sepsis. *Front Immunol*; 11. Epub ahead of print 4 August 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01726.
60. Arriola-Villalobos P, Fernandez-Perez C, Ariño-Gutierrez M, et al. Letter in response to article in journal of infection: “High SARS-CoV-2 antibody prevalence among healthcare workers exposed to COVID-19 patients”. *Journal of Infection* 2020; 81: e26–e28.
61. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang H-H, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* 2020; 26: 1636–1643.
62. Matsushima K, Yang D, Oppenheim JJ. Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine* 2022; 153: 155828.
63. Nikbakht F. The Effect of Enalapril on Inflammation and IL-1BETA and IL-8 Production in Chronic Arthritis. *DARU*, https://www.academia.edu/113669165/The_Effect_of_Enalapril_on_Inflammation_and_IL_1BETA_and_IL_8_Production_in_Chronic_Arthritis (2007, accessed 4 May 2025).
64. Henriquez KM, Hayney MS, Xie Y, et al. Association of interleukin-8 and neutrophils with nasal symptom severity during acute respiratory infection. *J Med Virol* 2015; 87: 330–337.
65. Pelaia C, Tinello C, Vatrella A, et al. Lung under attack by COVID-19-induced cytokine storm: pathogenic mechanisms and therapeutic implications. *Ther Adv Respir Dis* 2020; 14: 1753466620933508.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Análise de dados de expressão gênica relativa usando PCR quantitativo em tempo real e o método $2^{-\Delta\Delta C T}$. *Methods* 2001; 25: 402–408.
67. Tang DD. Critical role of actin-associated proteins in smooth muscle contraction, cell proliferation, airway hyperresponsiveness and airway remodeling. *Respir Res* 2015; 16: 134.
68. Berger P, Marthan R, Tunon de Lara J-M. [The pathophysiological role of smooth muscle cells in bronchial inflammation]. *Rev Mal Respir* 2002; 19: 778–794.
69. Hassoun D, Rose L, Blanc F-X, et al. Bronchial smooth muscle cell in asthma: where does it fit? *BMJ Open Resp Res* 2022; 9: e001351.
70. Lamers MM, van der Vaart J, Knoops K, et al. An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells. *EMBO J* 2021; 40: e105912.

71. Caputo I, Caroccia B, Frasson I, et al. Angiotensin II Promotes SARS-CoV-2 Infection via Upregulation of ACE2 in Human Bronchial Cells. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 5125.
72. Caputo I, Caroccia B, Seccia TM, et al. EFFECTS OF ACE INHIBITORS AND ANGIOTENSIN TYPE-1 RECEPTOR BLOCKERS ON ACE-2 EXPRESSION IN HUMAN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS. *Journal of Hypertension* 2021; 39: e414.
73. Wu Z, Hu R, Zhang C, et al. Elevation of plasma angiotensin II level is a potential pathogenesis for the critically ill COVID-19 patients. *Crit Care* 2020; 24: 290.
74. El-Arif G, Khazaal S, Farhat A, et al. Angiotensin II Type I Receptor (AT1R): The Gate towards COVID-19-Associated Diseases. *Molecules* 2022; 27: 2048.
75. Pucci F, Annoni F, dos Santos RAS, et al. Quantifying Renin-Angiotensin-System Alterations in COVID-19. *Cells* 2021; 10: 2755.
76. Melissa Hallow K, Dave I. RAAS Blockade and COVID-19: Mechanistic Modeling of Mas and AT1 Receptor Occupancy as Indicators of Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Balance. *Clin Pharmacol Ther* 2021; 109: 1092–1103.
77. Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 2005; 11: 875–879.
78. Rukhsana G, Uh-Hyun K, Assim A. A. Renin-angiotensin system at the interface of COVID-19 infection. *European Journal of Pharmacology* 2021; 890: 173656.
79. Mirjalili M, Soodejani MT, Raadabadi M, et al. Does Losartan reduce the severity of COVID-19 in hypertensive patients? *BMC Cardiovascular Disorders* 2022; 22: 116.
80. Tran KC, Asfar P, Cheng M, et al. Effects of Losartan on Patients Hospitalized for Acute COVID-19: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis* 2024; 79: 615–625.
81. Canals M, Jenkins L, Kellett E, et al. A regulação positiva do receptor de angiotensina II tipo 1 pelo proto-oncogene MAS é devida à ativação constitutiva de G q /G 11 pelo MAS *. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 16757–16767.
82. Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, et al. A Novel Gαq/11-selective Inhibitor *. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 47438–47445.
83. Lyngsø C, Erikstrup N, Hansen JL. Functional interactions between 7TM receptors in the Renin-Angiotensin System—Dimerization or crosstalk? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 302: 203–212.
84. Wen J, Tang B, Guo L, et al. miR-145 Alleviates Smooth Muscle Cell Phenotype Transition via ADAM17-Mediated ACE2 Shedding. *Int J Hypertens* 2023; 2023: 9497716.

85. Lu J, Sun PD. High affinity binding of SARS-CoV-2 spike protein enhances ACE2 carboxypeptidase activity. *J Biol Chem* 2020; 295: 18579–18588.
86. Gong J, Lu Z, Li R, et al. ACE2 inhibits proliferation of smooth muscle cell through AT1R and its downstream signaling pathway. *J Biosci* 2023; 48: 25.
87. Abassi Z, Higazi AAR, Kinaneh S, et al. ACE2, COVID-19 Infection, Inflammation, and Coagulopathy: Missing Pieces in the Puzzle. *Front Physiol*; 11. Epub ahead of print 6 October 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.574753.
88. Bourgonje AR, Abdulle AE, Timens W, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol* 2020; 251: 228–248.
89. Saponaro F, Rutigliano G, Sestito S, et al. ACE2 in the Era of SARS-CoV-2: Controversies and Novel Perspectives. *Front Mol Biosci* 2020; 7: 588618.
90. Banu N, Panikar SS, Leal LR, et al. Protective role of ACE2 and its downregulation in SARS-CoV-2 infection leading to Macrophage Activation Syndrome: Therapeutic implications. *Life Sci* 2020; 256: 117905.
91. Expression of ACE2, the SARS-CoV-2 Receptor, in Lung Tissue of Patients With Type 2 Diabetes | Diabetes | American Diabetes Association, <https://diabetesjournals.org/diabetes/article/69/12/2691/16501/Expression-of-ACE2-the-SARS-CoV-2-Receptor-in-Lung> (accessed 16 January 2025).
92. Fang L, Karakiulakis G, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet Respir Med* 2020; 8: e21.
93. Plesa M, Gaudet M, Mogas A, et al. Vitamin D3 Attenuates Viral-Induced Inflammation and Fibrotic Responses in Bronchial Smooth Muscle Cells. *Front Immunol* 2021; 12: 715848.
94. Celle A, Esteves P, Cardouat G, et al. Rhinovirus infection of bronchial epithelium induces specific bronchial smooth muscle cell migration of severe asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2022; 150: 104–113.
95. Khazaal S, Harb J, Rima M, et al. The Pathophysiology of Long COVID throughout the Renin-Angiotensin System. *Molecules* 2022; 27: 2903.
96. Melhorn J, Alamoudi A, Mentzer AJ, et al. Persistence of inflammatory and vascular mediators 5 months after hospitalization with COVID-19 infection. *Front Med*; 10. Epub ahead of print 10 February 2023. DOI: 10.3389/fmed.2023.1056506.
97. Sahu S, Patil CR, Kumar S, et al. Role of ACE2-Ang (1-7)-Mas axis in post-COVID-19 complications and its dietary modulation. *Mol Cell Biochem* 2022; 477: 225–240.
98. Klein N, Gembardt F, Supé S, et al. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 2013; 41: e334-343.

99. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, et al. G-Protein–Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation* 2005; 111: 1806–1813.
100. Evidence for a Functional Interaction of the Angiotensin-(1–7) Receptor Mas With AT1 and AT2 Receptors in the Mouse Heart | Hypertension, <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.hyp.0000175813.04375.8a> (accessed 22 January 2025).
101. Shen Y-L, Hsieh Y-A, Hu P-W, et al. Angiotensin-(1–7) attenuates SARS-CoV2 spike protein-induced interleukin-6 and interleukin-8 production in alveolar epithelial cells through activation of Mas receptor. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2023; 56: 1147–1157.
102. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev* 2018; 98: 505–553.
103. Chen Q, Yang Y, Huang Y, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury. *Journal of Surgical Research* 2013; 185: 740–747.
104. Magalhães GS, Rodrigues-Machado MG, Motta-Santos D, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *British J Pharmacology* 2015; 172: 2330–2342.
105. El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, et al. Angiotensin-(1–7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 1964–1976.
106. Magalhães GS, Rodrigues-Machado MG, Motta-Santos D, et al. Angiotensin-(1-7) attenuates airway remodelling and hyperresponsiveness in a model of chronic allergic lung inflammation. *British Journal of Pharmacology* 2015; 172: 2330–2342.
107. Li Y, Zeng Z, Li Y, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury by Regulating the Balance Between Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Shock* 2015; 43: 395.
108. Meng Y, Li T, Zhou G, et al. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin (1–7)/Mas Axis Protects Against Lung Fibroblast Migration and Lung Fibrosis by Inhibiting the NOX4-Derived ROS-Mediated RhoA/Rho Kinase Pathway. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22: 241–258.
109. Bunkenburg B, van Amelsvoort T, Rogg H, et al. Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 20: 746–754.
110. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression - PubMed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32192578/> (accessed 30 June 2025).

111. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 189–195.
112. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 2011; 41: 1203–1217.
113. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 355–362.
114. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 559–564.
115. Normanton M, Marti LC. Current data on IL-17 and Th17 cells and implications for graft versus host disease. *Einstein (Sao Paulo)* 2013; 11: 237–246.
116. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells | Clinical Science | Portland Press, <https://portlandpress.com/clinsci/article/119/2/75/68708/Regulation-in-chronic-obstructive-pulmonary> (accessed 16 May 2025).
117. Ozgur D, Karamese M, Alibeyoglu AM, et al. High levels of circulating IL-6 and IL-8 signature predicts COVID-19 severity. Epub ahead of print 31 January 2024. DOI: 10.22541/au.170666093.37282144/v1.
118. Chang Y-J, Liu CY-Y, Chiang B-L, et al. Induction of IL-8 Release in Lung Cells via Activator Protein-1 by Recombinant Baculovirus Displaying Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus Spike Proteins: Identification of Two Functional Regions¹. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 7602–7614.
119. Guo Q, Jin Y, Chen X, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Sig Transduct Target Ther* 2024; 9: 1–37.
120. Sauter NS, Thienel C, Plutino Y, et al. Angiotensin II Induces Interleukin-1 β -Mediated Islet Inflammation and β -Cell Dysfunction Independently of Vasoconstrictive Effects. *Diabetes* 2015; 64: 1273–1283.
121. (PDF) The effect of enalapril on inflammation and IL-B and IL-8 production in chronic arthritis. *ResearchGate*, https://www.researchgate.net/publication/261249259_The_effect_of_enalapril_on_inflammation_and_IL-B_and_IL-8_production_in_chronic_arthritis (accessed 4 May 2025).
122. Kai H, Kai M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensin II, and RAS inhibitors—lessons from available evidence and insights into COVID-19. *Hypertens Res* 2020; 43: 648–654.
123. Zhang J. Immune responses in COVID-19 patients: Insights into cytokine storms and adaptive immunity kinetics. *Heliyon* 2024; 10: e34577.
124. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiological Reviews* 2018; 98: 505–553.

125. Legrand M, Khanna AK, Ostermann M, et al. The renin–angiotensin–aldosterone-system in sepsis and its clinical modulation with exogenous angiotensin II. *Crit Care* 2024; 28: 389.
126. Almutlaq M, Mansour FA, Alghamdi J, et al. Angiotensin II Exaggerates SARS-CoV-2 Specific T-Cell Response in Convalescent Individuals following COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23: 8669.
127. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2076–2082.
128. Lane N, Robins RA, Corne J, et al. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells. *Clin Sci (Lond)* 2010; 119: 75–86.
129. Khan S, Shafiei MS, Longoria C, et al. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. *eLife* 2021; 10: e68563.
130. Kesika P, Thangaleela S, Sisubalan N, et al. The Role of the Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) Pathway in SARS-CoV-2 Infection. *Pathogens* 2024; 13: 164.
131. Zhang P, Zhu L, Cai J, et al. Association of Inpatient Use of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II Receptor Blockers With Mortality Among Patients With Hypertension Hospitalized With COVID-19. *Circ Res* 2020; 126: 1671–1681.
132. Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC, et al. Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockers on Cardiac Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Circulation* 2005; 111: 2605–2610.
133. Reynolds HR, Adhikari S, Pulgarin C, et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors and Risk of Covid-19. *N Engl J Med* 2020; NEJMoa2008975.