

LUCAS HENRIQUE FRANCISCO CUSTÓDIO

**PAPEL DA ANGIOTENSINA II SOBRE O ORGANOIDE
TRIDIMENSIONAL DE BRONQUÍOLO HUMANO
ESTIMULADO PELA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2**

**Araçatuba - SP
2026**

LUCAS HENRIQUE FRANCISCO CUSTÓDIO

**PAPEL DA ANGIOTENSINA II SOBRE O ORGANOIDE
TRIDIMENSIONAL DE BRONQUÍOLO HUMANO
ESTIMULADO PELA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Profa. Titular. Sandra Helena Penha de Oliveira

**Araçatuba - SP
2026**

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

C987p Custódio, Lucas Henrique Francisco.
Papel da Angiotensina II sobre o organoide tridimensional de bronquíolo humano estimulado pela proteína Spike do SARS-CoV-2 / Lucas Henrique Francisco Custódio. – Araçatuba, 2026
70 f. : il.

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

1. Angiotensina II 2. Glicoproteína da espícula de coronavírus 3. Sistema renina-angiotensina 4. Organoides 5. Inflamação I. T.

CDD 612

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, concedido por meio do processo nº: 2020/06476-0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, concedido por meio do processo nº: 301506/2022-1, e pela bolsa de mestrado, concedida por meio do processo nº: 130989/2024-0.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e a Faculdade de Odontologia, campus de Araçatuba.

À Sociedade Brasileira de Fisiologia e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas.

À minha orientadora, Profa. Titular Sandra Helena Penha de Oliveira.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, campus de Araçatuba.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, Neide Aparecida Francisco dos Santos e avó, Geni Francisco dos Santos, pelo apoio emocional e financeiro.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunofarmacologia da Faculdade de Odontologia, campus de Araçatuba.

Aos meus colegas do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia, campus de Araçatuba.

À todas as pessoas e entidades que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento dessa dissertação.

RESUMO

HENRIQUE FRANCISCO CUSTÓDIO, LUCAS. **Papel da angiotensina II sobre o organoide tridimensional de bronquíolo humano estimulado pela proteína Spike do SARS-CoV-2.** 2026. Dissertação – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

Este estudo investigou se a angiotensina II modula a liberação de citocinas e a expressão de componentes do sistema renina-angiotensina induzidas pela proteína *Spike* do SARS-CoV-2, em um modelo de organoide tridimensional de bronquíolo humano. Os organoides foram montados a partir de fibroblastos pulmonares (MRC-5), células epiteliais brônquicas (A549) e células musculares lisas brônquicas (BSMC) e estimulados com *Spike* (100 ng/mL), na presença ou na ausência de angiotensina II (100 nM). Os efeitos da modulação farmacológica do sistema renina-angiotensina foram avaliados pelo pré-tratamento com losartana, A779, AVE0991 e aceturato de diminazeno. A expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR, a liberação de citocinas por ELISA e a expressão proteica por imunohistoquímica fluorescente. Os organoides expressaram os principais componentes do SRA, incluindo renina, angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina, receptor de angiotensina II tipo 1, enzima conversora de angiotensina 2 e receptor Mas. A estimulação com *Spike* aumentou a expressão gênica de receptor de angiotensina II tipo 1 e receptor Mas, promoveu a liberação de TNF- α , IL-8 e CCL-2 e reduziu a expressão proteica da enzima conversora de angiotensina 2. A angiotensina II, isoladamente, aumentou os níveis de renina e do receptor de angiotensina II tipo 1 e a liberação de IL-1 β , além de reduzir a expressão proteica da enzima conversora de angiotensina 2. Além disso, a sensibilização com angiotensina II modificou a resposta à *Spike*, aumentando a expressão de renina, receptor de angiotensina II tipo 1 e enzima conversora de angiotensina II, e reduzindo a expressão do receptor Mas em comparação com aos organoides estimulados apenas com *Spike*. A modulação farmacológica do sistema renina-angiotensina intensificou ainda mais essas respostas. A losartana reduziu a liberação de TNF- α e IL-8 e diminuiu a expressão gênica da enzima conversora de angiotensina 2, enquanto aceturato de diminazeno e AVE0991 atenuaram a liberação de TNF- α , IL-1 β e CCL-2, aumentaram a expressão de MASR e reduziram a expressão gênica da enzima conversora de angiotensina 2. Esses achados indicam que a angiotensina II amplifica as respostas inflamatórias induzidas pela *Spike* e altera

a regulação dos componentes do SRA nos organoides, favorecendo a produção de citocinas e o desequilíbrio entre os eixos protetor e deletério do sistema renina-angiotensina. A ativação farmacológica do eixo alternativo do sistema renina-angiotensina atenuou esses efeitos, destacando o receptor Mas como uma estratégia terapêutica potencial para limitar a inflamação associada à COVID-19.

Palavras-chave: Angiotensina II; Glicoproteína da espícula de coronavírus; Sistema renina-angiotensina; Organoides; Inflamação.

ABSTRACT

HENRIQUE FRANCISCO CUSTÓDIO, LUCAS. **Role of angiotensin II on the three-dimensional organoid of human bronchiole stimulated by the SARS-CoV-2 Spike protein.** 2026. Dissertação – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

This study investigated whether angiotensin II modulates cytokine release and the expression of renin–angiotensin system components induced by the SARS-CoV-2 Spike protein in a three-dimensional human bronchiolar organoid model. The organoids were assembled from lung fibroblasts (MRC-5), bronchial epithelial cells (A549), and bronchial smooth muscle cells (BSMCs) and stimulated with Spike (100 ng/mL) in the presence or absence of angiotensin II (100 nM). The effects of pharmacological modulation of the renin–angiotensin system were evaluated by pretreatment with losartan, A779, AVE0991, and diminazene aceturate. Gene expression was assessed by RT-qPCR, cytokine release by ELISA, and protein expression by fluorescence immunohistochemistry. The organoids expressed the major components of the renin–angiotensin system, including renin, angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor, angiotensin-converting enzyme 2, and Mas receptor. Stimulation with Spike increased the gene expression of the angiotensin II type 1 receptor and Mas receptor, promoted the release of TNF- α , IL-8, and CCL-2, and reduced angiotensin-converting enzyme 2 protein expression. Angiotensin II alone increased renin and angiotensin II type 1 receptor levels and IL-1 β release, while also reducing angiotensin-converting enzyme 2 protein expression. Furthermore, sensitization with angiotensin II modified the response to Spike, increasing the expression of renin, the angiotensin II type 1 receptor, and angiotensin-converting enzyme and reducing Mas receptor expression compared with organoids stimulated with Spike alone. Pharmacological modulation of the renin–angiotensin system further intensified these responses. Losartan reduced TNF- α and IL-8 release and decreased angiotensin-converting enzyme 2 gene expression, whereas diminazene aceturate and AVE0991 attenuated the release of TNF- α , IL-1 β , and CCL-2, increased MASR expression, and reduced angiotensin-converting enzyme 2 gene expression. These findings indicate that angiotensin II amplifies Spike-induced inflammatory responses and alters the regulation of renin–angiotensin system components in organoids, promoting cytokine production and an imbalance between

the protective and deleterious axes of the renin–angiotensin system. Pharmacological activation of the alternative renin–angiotensin system axis attenuated these effects, highlighting the Mas receptor as a potential therapeutic target for limiting COVID-19-associated inflammation.

Keywords: Angiotensin II; Spike Glycoprotein, Coronavirus; Renin-Angiotensin System; Organoids; Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2 e suas proteínas estruturais	17
Figura 2 – Representação esquemática da proteína Sp homotrimérica do SARS-CoV-2	18
Figura 3 – Representação esquemática do SRA em condições fisiológicas e durante a infecção pelo SARS-CoV-2	22
Figura 4 – Caracterização morfológica dos OTBs	32
Figura 5 – Marcadores fenotípicos de células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos pulmonares nos OTBs	33
Figura 6 – Expressão basal de RNAm de ECA2 em diferentes linhagens celulares	35
Figura 7 – Expressão gênica dos componentes do SRA em OTBs	37
Figura 8 – Expressão proteica de AT1R em OTBs	39
Figura 9 – Expressão proteica de ECA2 OTBs	40
Figura 10 – Expressão proteica dos componentes de MASR em OTBs	41
Figura 11 – Expressão de citocinas inflamatórias em OTBs	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Concentrações das drogas utilizadas nos OTBs	28
Quadro 2 – Lista de ensaios inventariados TaqMan™ Gene Expression Assays	29
Quadro 3 – Resumo da intensidade qualitativa de imunofluorescência para AT1R, ECA2 e MASR em OTBs	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
+ssRNA	Ácido ribonucleico fita simples com senso positivo
2D	bidimensional
3D	Tridimensional
AGT	Angiotensinogênio
Ang	1-7 Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AT1R	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina tipo 2
BA.3.2	Variante "CIDADA" do Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
CCL-2	Ligante de quimiocina motivo C-C 2
CCL-3	Ligante de quimiocina motivo C-C 3
COVID	Coronavirus Disease
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CT	Cauda citoplasmática
CXCL10	Ligante de quimiocina motivo C-X-C 10
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima
ERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2

g	Aceleração da gravidade da Terra
HR1	Repetição heptádica 1
HR2	Repetição heptádica 2
IHC	Imunohistoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IP-10	Proteína induzida por interferon gama 10
L	Litro
LM	Levitação magnética
mL	Mililitro
MASR	Receptor Mas
MEC	Matriz extracelular
MERS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
mg	Miligrama
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MrgD	Mas-related G-protein coupled receptor member D
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
NTD	Domínio N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde

ORF10	Fase aberta de leitura 10
ORF3a	Fase aberta de leitura 3a
ORF3b	Fase aberta de leitura 3b
ORF3c	Fase aberta de leitura 3c
ORF3d	Fase aberta de leitura 3d
ORF6	Fase aberta de leitura 6
ORF7a	Fase aberta de leitura 7a
ORF7b	Fase aberta de leitura 7b
ORF8	Fase aberta de leitura 8
ORF9b	Fase aberta de leitura 9b
ORF9c	Fase aberta de leitura 9c
RBD	Domínio de ligação do receptor
RBM	Motivo de ligação ao receptor
REN	Renina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
S1	Subunidade 1
S2	Subunidade 2
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SCF	Sítio de clivagem da furina
SD1	Subdomínio 1
SD2	Subdomínio 2

SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRA	Sistema renina-angiotensina
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
μ M	Micromolar
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Cultura de células	27
3.2 Magnetização celular, montagem da co-cultura 3D e formação dos OTBs	28
3.3 Estimulação com Sp do SARS-CoV-2 e Ang II	29
3.4 Análise da expressão gênica dos componentes do SRA por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).	30
3.5 Quantificação da liberação de citocinas por ELISA sanduíche	31
3.6 Histologia e imunohistoquímica de fluorescência (IHF)	32
3.7 Análise estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterização morfológica dos OTBs	32
4.2 Marcadores fenotípicos de células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos pulmonares em OTBs	32

4.3 O RNAm de ECA2 é mais expresso nos OTBs do que nas células individuais	35
4.4 O OTB expressa componentes do SRA, e a Ang II regula a expressão desses componentes induzida por Sp	36
4.5 Regulação dos níveis proteicos de AT1R, ECA2 e MASR sob condições de estímulo com Sp e modulação pela Ang II	38
4.6 Os OTBs estimulados com Sp expressam e liberam citocinas inflamatórias	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, relatos iniciais de uma pneumonia viral atípica começaram a surgir em Wuhan, na China (Worobey, 2021). O agente etiológico responsável foi um novo coronavírus, identificado a partir de amostras de fluido de lavagem bronco alveolar (Zhu *et al.*, 2020). Ele foi denominado SARS-CoV-2 (Gorbalenya *et al.*, 2020). O MERS-CoV e o SARS-CoV são outras espécies de coronavírus que já foram responsáveis por surtos anteriores de doenças respiratórias, que, cada um, acumulou mais de 700 mortes mundialmente (Xie; Chen, 2020), tornando os coronavírus uma questão de atenção para a saúde pública mundial. Após a ocorrência de 118.000 casos de COVID-19, nome dado à doença causada pelo SARS-CoV-2, em 114 países, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou uma pandemia dessa doença em 11 de março de 2020 (CDC, 2024). Até março de 2026, foram confirmados mais de 779.207.696 casos e 7.114.028 mortes no mundo (“WHO COVID-19 dashboard”, 2026). No Brasil, a última atualização do portal Coronavírus Brasil, do Ministério da Saúde, indica um total de 39.318.227 casos notificados e 716.626 óbitos (“Coronavírus Brasil”, 2025).

A manifestação clínica da COVID-19 passou por uma significativa recharacterização ao longo dos últimos anos, evoluindo de um foco pulmonar para uma síndrome complexa que acomete múltiplos órgãos. Os sintomas causados variam significativamente conforme a gravidade do caso; de fato, em alguns pacientes, a COVID-19 pode se manifestar assintomaticamente por até 10 dias após o início da infecção (Lauer *et al.*, 2020). A fase aguda da doença caracteriza-se tipicamente por sintomas respiratórios, como tosse, coriza excessiva, febre persistente e dor de garganta, e, em casos mais graves, por hipoxemia, pneumonia e síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (CDC, 2025; Han *et al.*, 2022). Manifestações extrapulmonares da COVID-19 são comuns e afetam múltiplos órgãos além dos pulmões. Entre essas manifestações, destacam-se as gastrointestinais (diarreia, vômitos), neurológicas (cefaleia, tontura, anosmia), cardiovasculares (miocardite, arritmias), renais (lesão renal aguda), dermatológicas (erupções cutâneas) e hematológicas (trombose) (Finsterer *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2020). Quanto à transmissão do SARS-CoV-2, ela ocorre por contato com fluidos respiratórios de pessoas infectadas, seja por contato

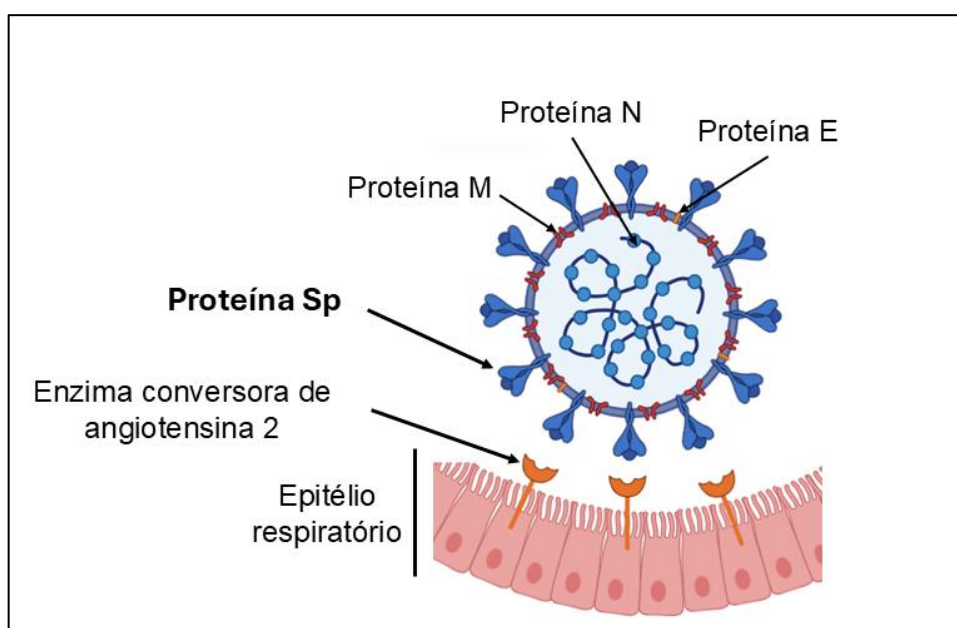
direto, com aerossóis liberados na fala e respiração, como muco e saliva, ou por contato indireto com objetos e superfícies contaminadas (Abd *et al.*, 2020)

De acordo com a OMS, a COVID longa, ou condição pós-COVID-19, pode ser definida como a presença de sintomas que surgem em torno de três meses após uma infecção por SARS-CoV-2, que persistem por pelo menos dois meses e não podem ser explicados por outros diagnósticos (Soriano *et al.*, 2022). Tais sintomas se manifestam em diferentes órgãos e incluem fadiga, dificuldade de respiração, dor de cabeça e dor no peito, além de sequelas neurológicas, como déficit cognitivo e insônia (Al-Aly; Rosen, 2024; Rahmati *et al.*, 2025). Os sintomas podem persistir por até um ano na maioria dos indivíduos afetados; porém, em pacientes com comorbidades e histórico de internações anteriores, o tempo pode ser maior (Rigoni *et al.*, 2022; Rocha *et al.*, 2024). Atualmente, não há tratamento específico para a COVID longa; o manejo é voltado diretamente ao controle dos sintomas, e abordagens multidisciplinares são necessárias para a reabilitação e o suporte aos pacientes (Lemhöfer *et al.*, 2023; Robert Koch-Institut, 2026). Acredita-se que a COVID longa possa ser causada pela persistência de material genético viral em reservatórios localizados nos tecidos corporais, no plasma e nas células sanguíneas, que mantêm, localmente, os sintomas e a inflamação crônica observados nessa condição persistente (Feifan He *et al.*, 2024; Peluso *et al.*, 2024a, 2024b). De fato, esses reservatórios podem ser alvos de terapias que visam eliminar ou reduzir o material genético residual do SARS-CoV-2, por meio de abordagens como o uso de antivirais, anticorpos monoclonais e imunoterapias baseadas na transferência adotiva de células T específicas contra o vírus (Proal *et al.*, 2025). No entanto, ainda não há tratamentos aprovados com eficácia comprovada (Proal *et al.*, 2025).

A vacinação contra o SARS-CoV-2 desempenhou um papel central no controle da pandemia de COVID-19, ao reduzir significativamente o número de hospitalizações, de casos graves e de mortes (Korang *et al.*, 2022). Um estudo de meta-análise demonstrou que, dentre diversos tipos de vacinas aprovadas, embora todas reduzam significativamente a incidência de COVID-19, as vacinas de RNAm e de vírus inativado se mostram as mais eficientes. Além disso, em relação à segurança, não foram observados grandes eventos adversos graves relevantes, além de efeitos mais comuns como dor no local da injeção e fadiga (Killingley *et al.*, 2022)

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus pertencente à subfamília *Coronavirinae* da família *Coronaviridae* (Wang *et al.*, 2020). Ele compartilha cerca de 79% de seu genoma com o SARS-CoV-2 e 50% com o MERS-CoV (Lu *et al.*, 2020). Consiste em um vírus envelopado, com genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), que codifica quatro proteínas estruturais principais: proteína *spike* (Sp), proteína do nucleocapsídeo (N), proteína da membrana (M) e proteína do envelope (E) (**Figura 1**) (Wang *et al.*, 2020). Onze proteínas acessórias também são codificadas, sendo elas: ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c e ORF10 (Redondo *et al.*, 2021).

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2 e suas proteínas estruturais



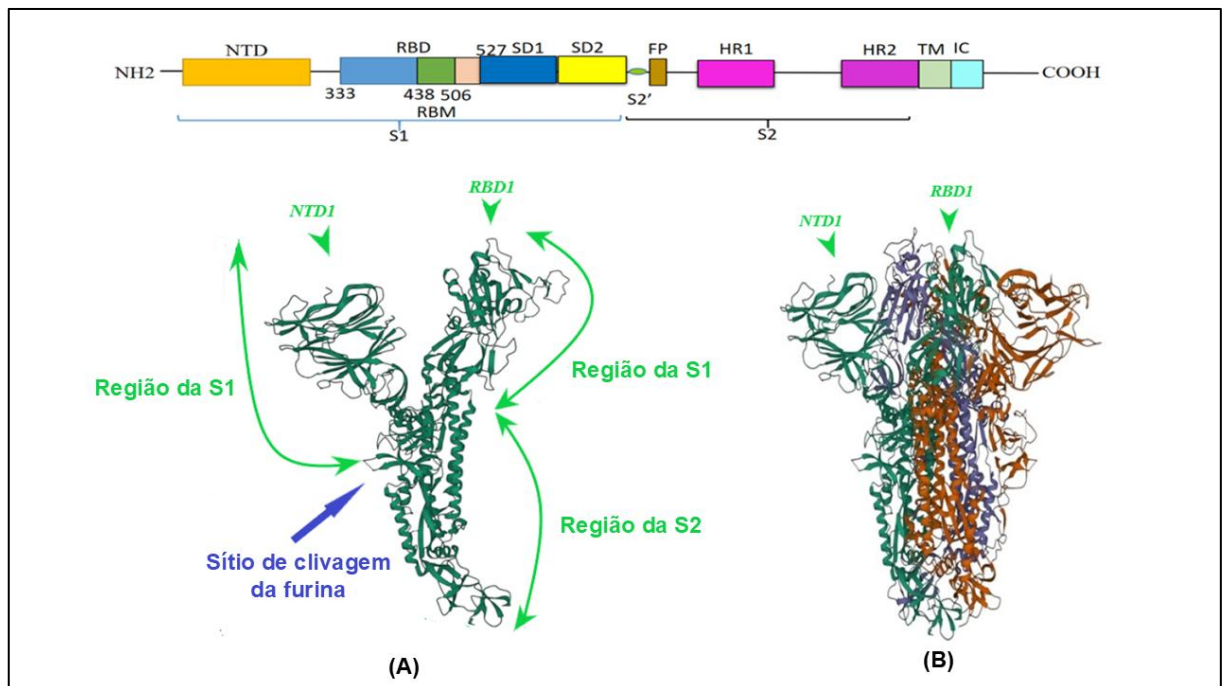
Fonte: Wang *et al.*, 2020.

Legenda: O SARS-CoV-2 é um retrovírus envelopado composto por quatro proteínas estruturais principais: nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e *spike* (Sp). Fonte: autoria própria.

A proteína Sp do SARS-CoV-2 é uma glicoproteína homotrimérica responsável por mediar a entrada do vírus nas células hospedeiras e é composta por duas subunidades funcionais, S1 e S2, presentes em cada monômero (Figura 2) (Wang *et al.*, 2020). A subunidade S1 é subdividida em uma sequência de sinalização, o domínio N-terminal (NTD), o domínio de ligação ao receptor (RBD), o motivo de

ligação ao receptor (RBM) e dois subdomínios (SD1 e SD2) (Berger; Schaffitzel, 2020). Já a subunidade S2 consiste em um peptídeo de fusão (FP), uma repetição heptádica 1 e 2 (HR1 e HR2), um domínio transmembrana (TM) e uma cauda citoplasmática (CT) (Shah *et al.*, 2021). Na junção entre as duas subunidades, localiza-se o sítio de clivagem da furina (SCF), composto por uma sequência de 4 aminoácidos. Ele facilita a clivagem das subunidades S1 e S2 por proteases do hospedeiro, como a furina, sendo essencial para a entrada viral (Sasaki *et al.*, 2021a).

Figura 2 – Representação esquemática da proteína Sp homotrimérica do SARS-CoV-2



Fonte: Nejat; Torshizi; Najafi, 2023. Adaptado

Legenda: (A) A estrutura de apenas um dos três monômeros da Sp: as setas verdes apontam seu NTD (NTD1) e RBD (RBD1) e indicam a região ocupada pelas subunidades S1 e S2. A seta azul indica a região onde se encontra o SCF. (B) Esquema demonstrando os três monômeros da Sp, as setas verdes apontam o NTD (NTD1) e RBD (RBD1) do primeiro monômero.

O SARS-CoV-2 infecta primariamente as células epiteliais do trato respiratório superior e, em última instância, os pneumócitos tipo 2 dos alvéolos (Hou *et al.*, 2020). A entrada viral nas células é mediada primariamente pela ligação do RBD da porção S1 ao domínio extracelular da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), uma

peptidase transmembrana (Aleem; Akbar Samad; Vaqar, 2026), o que inicia uma desestabilização alostérica no sítio de clivagem da furina na interface ECA S1/S2, que é posteriormente clivada, principalmente pela furina (Nejat; Torshizi; Najafi, 2023; Örd; Faustova; Loog, 2020). Ainda após a clivagem da furina, as subunidades S1 e S2 permanecem covalentemente ligadas (Xia, 2021). Outro sítio de clivagem ainda está presente na Sp, localizado no domínio S2, denominado S2', no qual a clivagem é mediada principalmente pela ação da serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) do hospedeiro, assim como ocorre no SARS-CoV-2 (Park *et al.*, 2016). Tal ação proteolítica resulta no desprendimento da subunidade S1 e na exposição do FP, que, devido às suas características hidrofóbicas, se insere na membrana plasmática da célula hospedeira e induz a fusão entre a membrana viral e a do hospedeiro (Fan *et al.*, 2020).

A ligação da Sp com a ECA2 promove uma regulação negativa da ECA2 por dois mecanismos principais: clivagem mediada pela ADAM17 e internalização do complexo Sp-ECA2. A ADAM17 é uma metaloproteinase transmembrana que cliva uma variedade de proteínas, entre elas a ECA2 (Eguchi *et al.*, 2018). Fisiologicamente, a ADAM17 apresenta baixa atividade constitutiva de clivagem sobre o domínio extracelular da ECA2 (Lambert *et al.*, 2005), liberando a ECA2 solúvel (sECA2), que mantém atividade catalítica (Jia *et al.*, 2009). Sabe-se que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode aumentar a atividade da ADAM17, levando à diminuição da disponibilidade de ECA2 na membrana celular, o que pode contribuir para a progressão para casos graves de COVID-19 (Sun *et al.*, 2024). Paralelamente, a ligação do vírus à célula também promove a diminuição da ECA2, diretamente pela formação do complexo Sp-ECA2, que sofre endocitose mediada por clatrina e AP2, de modo que a ECA2 é internalizada e, posteriormente, degradada em um lisossomo (Lu *et al.*, 2022). Interessantemente, a administração da proteína Sp recombinante a células em cultura é capaz de promover a endocitose de ECA2 (Gorshkov *et al.*, 2020) e aumentar a atividade de ADAM17 (Pedrosa *et al.*, 2021), mesmo na ausência do restante do aparato viral.

Um aspecto importante do SARS-CoV-2 é que, assim como outros vírus de RNA, ele frequentemente sofre modificações em sua sequência gênica durante a replicação nas células do hospedeiro (Bostanghadiri *et al.*, 2023). Nesse contexto, as agências de saúde mantêm monitoramento contínuo dessas mutações, com destaque

para as subvariantes da Ômicron, a fim de avaliar seu impacto na transmissibilidade e na gravidade da COVID-19 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2026).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema fisiológico hormonal que participa da regulação da pressão arterial, por meio de uma cascata iniciada pela renina (REN), liberada pelas células justa glomerulares das arteríolas aferentes renais na circulação sanguínea, a qual cliva o angiotensinogênio (AGT), liberado pelo fígado, em angiotensina I (Ang I); esta, por sua vez, é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA), localizada principalmente no endotélio pulmonar, em angiotensina II (Ang II) (Kaur; Rout, 2026). Além do eixo sistêmico, existe um eixo local, no qual os componentes do SRA são expressos e atuam em diversos tecidos, como o adiposo, cardíaco, vascular, neural, linfático, a pele e o intestino (Paul; Poyan Mehr; Kreutz, 2006). O SRA também exibe uma notável integração com o sistema imune, participando da resposta imune inata e adaptativa (Crowley; Rudemiller, 2017). Além disso, células imunológicas, como linfócitos T e células natural killer, são capazes de expressar seus componentes (Jurewicz *et al.*, 2007).

A Ang II é o principal peptídeo ativo do SRA e atua sobre dois receptores: o receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) e o receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R). Além de ser formada a partir da Ang I, ela também pode ser sintetizada por outras enzimas em sistemas RAS locais, como os pulmonares, cardíacos e renais (Atlas, 2007). O AT1R, por sua vez, assim como outros componentes do SRA, é amplamente expresso nos tecidos corporais. Sua ativação, por meio da ligação à Ang II, promove vasoconstrição, redução da excreção de sódio, liberação de aldosterona, de citocinas pró-inflamatórias, fibrose, remodelação tecidual e estresse oxidativo (Crowley *et al.*, 2006; Kanugula *et al.*, 2023a; Santos *et al.*, 2019). Dessa forma, a Ang II participa do eixo clássico do SRA, também conhecido como eixo inflamatório ou eixo ECA/Ang II/AT1R.

A ECA2 é uma metaloproteinase transmembrana dependente de Zn^{2+} . Ela é composta por 805 aminoácidos e apresenta considerável homologia com a ECA, com a qual compartilha cerca de 42% da sequência de aminoácidos (Lubbe *et al.*, 2020). Além de estar expressa no epitélio das vias aéreas, ela também é encontrada na mucosa oral, no intestino, no coração, no rim, no pâncreas, nas gônadas, na medula óssea e nos linfócitos (Nehme *et al.*, 2015). A ampla variedade de tecidos nos quais a

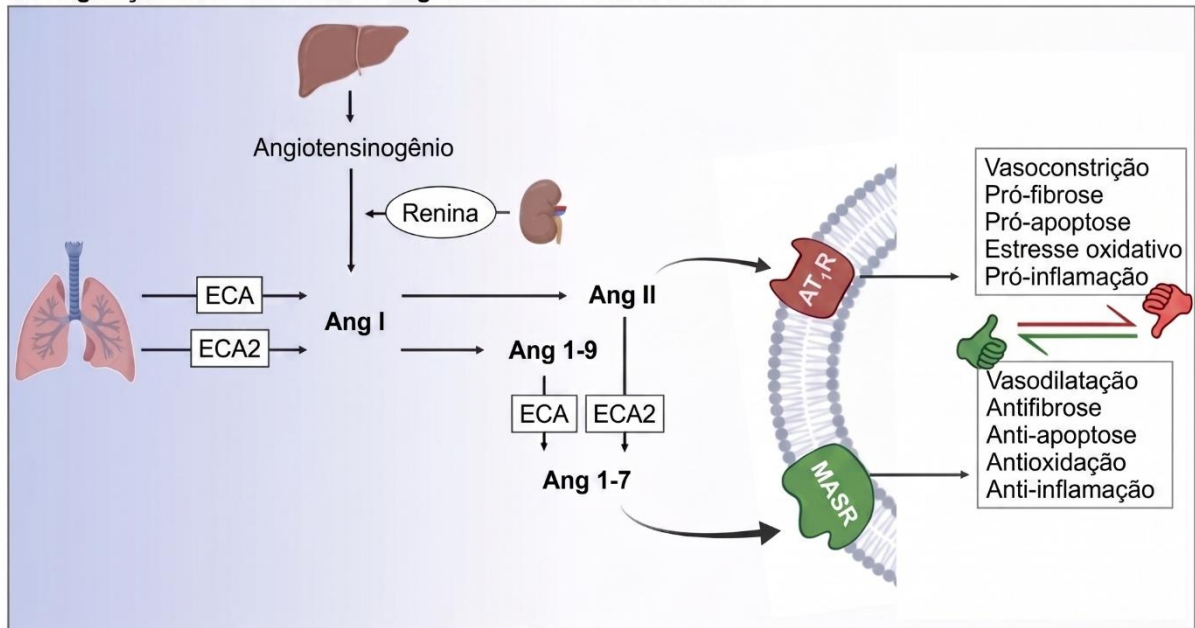
ECA2 é expressa pode explicar por que a COVID-19 apresenta tantas manifestações extrapulmonares (Dong *et al.*, 2020). A ECA2 promove uma regulação negativa do SRA pela conversão da Ang II em Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e da Ang I em Angiotensina 1-9, a qual pode ser posteriormente convertida em Ang 1-7 pela ECA (Vargas Vargas; Varela Millán; Fajardo Bonilla, 2022). A ampla gama de tecidos em que a ECA2 é expressa indica potencial de infecção sistêmica pelo SARS-CoV-2 (Yan *et al.*, 2020). Interessantemente, a expressão de ECA2 no pulmão é baixa, em contraste com o observado nas vias aéreas superiores, de modo que há um gradiente de infecção por SARS-CoV-2 que diminui em direção às vias aéreas inferiores (Hou *et al.*, 2020). A Ang 1-7, gerada pela ECA2, se opõe à Ang II, sendo essa o ligante natural do receptor Mas (MASR), um receptor transmembranar acoplado à proteína G (Rein; Bader, 2017). Já foi reportado que a ativação do MASR é capaz de induzir efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos, por meio de supressão de vias como ERK1/2 e NF- κ B (El-Hashim *et al.*, 2012; Prestes *et al.*, 2017). Dessa forma, a Ang 1-7 é capaz de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, e aumentar a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (Pan *et al.*, 2021). Assim, a ECA2 integra o ECA2/Ang 1-7/MASR, um eixo alternativo do SRA, também referido como eixo protetor ou anti-inflamatório (Vargas Vargas; Varela Millán; Fajardo Bonilla, 2022). Apesar de não terem um papel tão significativo na COVID-19, é importante salientar que o SRA possui outros eixos alternativos. Ao contrário do AT1R, o AT2R está associado a efeitos benéficos, uma vez que sua ativação pela Ang II contrabalança processos patológicos e o desenvolvimento de lesão tecidual mediados pelo AT1R, promovendo efeitos vasodilatadores e anti-inflamatórios (Kaschina; Namsolleck; Unger, 2017). Além disso, destaca-se o eixo alamandina/receptor MrgD, no qual a alamandina exerce, por meio do receptor MrgD, efeitos vasodilatadores, antifibróticos, anti-inflamatórios e anti-hipertróficos (Bostanghadiri *et al.*, 2023; Schleifenbaum, 2019).

A redução da quantidade de ECA2 provoca uma regulação positiva do eixo ECA/Ang II/AT1R. De forma que a infecção pelo SARS-CoV-2 leva a uma redução da disponibilidade de ECA2, provocando diminuição da geração de Ang 1-7 e aumento da retenção de Ang II (Figura 3). Devido a esse aumento da quantidade de Ang II circulante, ocorre hiperativação do AT1R e de seus efeitos pró-inflamatórios (Banu *et al.*, 2020). Sabe-se que a expressão negativa de ECA2 está relacionada ao

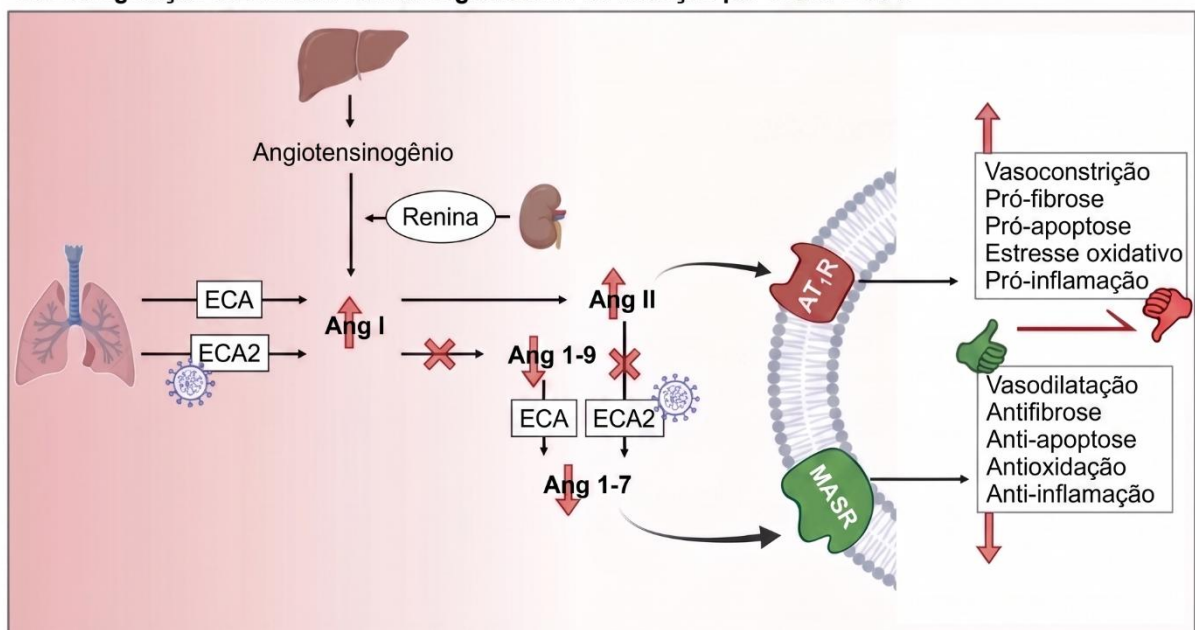
desenvolvimento de hipertensão arterial pulmonar (Shen *et al.*, 2020), SRAG (Imai *et al.*, 2005) e lesão pulmonar aguda (Klein *et al.*, 2013). Pacientes com COVID-19 também apresentam níveis significativamente menores de Ang 1-7 circulante no plasma sanguíneo, incluindo aqueles admitidos em unidades de tratamento intensivo (Henry *et al.*, 2021). Além disso, concentrações séricas elevadas de Ang II foram observadas em pacientes críticos com COVID-19 e correlacionadas com altos níveis de células CD4 e CD8 (Liu *et al.*, 2020). Portanto, a infecção por SARS-CoV-2 está relacionada a um desequilíbrio persistente entre os eixos do SRA, caracterizado pela predominância do eixo inflamatório. De fato, o aumento de Ang II em relação a Ang 1-7 já foi associado a pior prognóstico e a maior hospitalização e mortalidade por COVID-19 (Pucci *et al.*, 2021).

Figura 3 – Representação esquemática do SRA em condições fisiológicas e durante a infecção pelo SARS-CoV-2

A. Regulação do sistema renina-angiotensina no estado saudável



B. Desregulação do sistema renina-angiotensina na infecção por SARS-CoV-2



Fonte: (Khazaal *et al.*, 2022). Adaptado.

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

A infecção por SARS-CoV-2 promove uma pronunciada liberação de citocinas inflamatórias e uma fraca resposta de interferons (Hussman, 2020). Essa liberação é, em parte, promovida pela ativação do eixo ECA/Ang II/AT1R, que modula a expressão gênica de várias dessas citocinas pela via de sinalização de NF- κ B, além de influenciar positivamente a atividade de macrófagos (Banu *et al.*, 2020; Hirano; Murakami, 2020). A sinalização mediada por receptores do tipo Toll também contribui para esse estado pró-inflamatório (Aboudounya; Heads, 2021). Essa liberação pronunciada de citocinas foi denominada “tempestade de citocinas”. Ela é iniciada devido a um descontrole inflamatório provocado pela rápida propagação do vírus, que inicialmente causa danos pulmonares e pode evoluir para sepse e falha múltipla de órgãos (Mangalmurti; Hunter, 2020; Song *et al.*, 2020). As citocinas liberadas incluem IL-1, IL-1 β , IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TGF- β , CCL-2, CCL-3, CXCL10, IP-10 (Banu *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Hussman, 2020).

A cultura bidimensional (2D) é tradicionalmente empregada na pesquisa com células aderentes. Consiste em um modelo em que as células crescem em uma monocamada, aderidas a um substrato de plástico ou vidro, e o contato com outras células ocorre apenas pela periferia (Antoni *et al.*, 2015a; Breslin; O’Driscoll, 2013). Ela oferece vantagens como a alta capacidade de replicabilidade de experimentos e a facilidade na interpretação dos resultados (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Tradicionalmente, apenas um tipo celular é cultivado em condições genéticas, morfológicas e fisiológicas padronizadas, nas quais não há matriz extracelular (MEC) nem gradientes de oxigênio, nutrientes e excretas (Antoni *et al.*, 2015b; Costa *et al.*, 2016). Dessa forma, os modelos de estudo em cultura 2D apresentam inúmeras limitações e representam de forma imprecisa as condições em que as células se encontram *in vivo* (Jensen; Teng, 2020). Uma alternativa à metodologia 3D é o uso de culturas tridimensionais (3D), que permitem a formação de organoides, representações *in vitro* que mimetizam aspectos estruturais e funcionais de órgãos. Tais organoides podem ser formados a partir de diferentes linhagens celulares e são capazes de apresentar respostas celulares mais próximas às que ocorrem *in vivo*, por possibilitarem, por exemplo, a comunicação entre todos os domínios celulares e destes com a MEC (Duval *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2022). Outros benefícios do uso de modelos de cultura 3D incluem o metabolismo de drogas e expressão gênica mais

próximos do órgão em que os modelos são baseados (Antoni *et al.*, 2015b; Ravi *et al.*, 2015).

A levitação magnética (LM) é uma das técnicas de cultura 3D que podem ser empregadas na construção de um organoide. Nela, nanopartículas magnéticas são introduzidas nas células em cultura e, então, um ímã externo é utilizado para agregá-las em um esferoide (Jensen; Teng, 2020). Diversos modelos de organoides com tipos celulares diferentes podem ser criados com a LM, uma técnica versátil e simples, quando comparada a outras técnicas similares, que resulta em modelos 3D representativos (Haisler *et al.*, 2013).

Diversos modelos *in vitro* e *in vivo* podem ser utilizados na pesquisa do SARS-CoV-2. Há vários fatores que complicam o estudo da COVID-19, como a insuficiência de modelos *in vitro* adequados e a dificuldade de utilizar animais, devido aos aspectos éticos e às condições de trabalho sob biossegurança de nível 3 (Seixas *et al.*, 2023). Visto isso, organoides de pulmão e de outros órgãos vêm sendo utilizados em trabalhos com SARS-CoV-2 para melhor compreender os mecanismos de infecção, respostas inflamatórias e cinética viral (Deguchi *et al.*, 2021; Sano *et al.*, 2022)

Apesar dos avanços no desenvolvimento e na distribuição de vacinas contra a COVID-19, a emergência de novas variantes do vírus, como a BA.3.2, representa uma preocupação contínua quanto de sua propagação (Mila Shakya *et al.*, 2026). O SARS-CoV-2 ainda permanece circulando e ameaçando a saúde humana; de fato, em março de 2025, a cidade de São Miguel da Cachoeira voltou a impor a obrigatoriedade do uso de máscaras pela população, devido a um aumento de casos de COVID-19 (Nascimento, 2025). Uma vez que essa doença respiratória continua a provocar internações e óbitos, embora em números substancialmente inferiores aos observados durante a pandemia, destaca-se a importância de novos trabalhos sobre a COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando que a literatura ainda é escassa em estudos que mostram o papel do SRA local no contexto do SARS-CoV-2 em modelos tridimensionais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel da Ang II na produção de citocinas e na expressão dos componentes do SRA em OTBs, produzidos a partir de uma co-cultura 3D de células pulmonares humanas, estimulados pela proteína Sp do SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão gênica dos componentes dos principais componentes do SRA nos OTB produzidos a partir de uma co-cultura 3D de células pulmonares humanas, estimulados pela proteína Sp do SARS-CoV-2, na presença de Ang II, por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR);
- b) Avaliar a expressão proteica de ECA2, AT1R e MASR nos OTB produzidos a partir de uma co-cultura 3D de células pulmonares humanas, estimulados pela proteína Sp do SARS-CoV-2, na presença de Ang II, por imunohistoquímica de fluorescência;
- c) Avaliar a produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , CCL-2 e IL-8 nos OTBs produzidos a partir de uma co-cultura 3D de células pulmonares humanas, estimulados pela proteína Sp do SARS-CoV-2, na presença de Ang II, pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) sanduíche;
- d) Avaliar os mecanismos envolvidos na expressão dos componentes do SRA e na produção de citocinas induzida pela proteína Sp, bem como o papel da Ang II, por meio do pré-tratamento dos OTBs produzidos a partir de uma co-cultura 3D de células pulmonares com LOS, A779, DIZE ou AVE

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Para a construção dos OTBs, três linhagens diferentes de células humanas foram cultivadas: fibroblastos pulmonares (MRC-5), células epiteliais brônquicas (A549) e células musculares lisas brônquicas (BSMC), entre as passagens 5 e 8. As células MRC-5 (Código: 0180) e A549 (Código: 0033) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, enquanto as BSMC (Código: CC-2576) foram adquiridas da Lonza Biosciences. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (11885084, Gibco) suplementado com 1% de solução de aminoácidos não-essenciais (11140050, Gibco), 1% de piruvato de sódio (P5280, Sigma-Aldrich), 200 mM L-glutamina (G5792, Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino (10270106, Gibco), 1% penicilina (15140122, Gibco), 0.1% anfotericina B (15290018, Gibco) e 0.1% gentamicina (15750060, Gibco). As células foram cultivadas até a confluência apropriada e, então, foi realizado repique com solução de tripsina-EDTA a 0,25% (25200056, Gibco) para a montagem subsequente.

3.2 Magnetização celular, montagem da co-cultura 3D e formação dos OTBs

Após o repique, cada tipo celular foi contado em um hemocitômetro de Neubauer e transferido para um tubo de centrifuga individualizado de 15 ml. Em cada tubo, após a adição de uma solução de nanopartículas magnéticas (657841, NanoShuttle-PL, Greiner Bio-One), na proporção de 0,5 µL de solução a cada 10000 células, as células foram magnetizadas por centrifugação (três vezes, por 5 minutos, a 100 × g). Após a magnetização, foi realizado o plaqueamento das células em uma placa de 24 poços com superfície repelente de células (662970, Greiner Bio-One) na densidade de 1×10^5 por poço por tipo celular, totalizando 3×10^5 , formando uma co-cultura 3D. A união das células por magnetização para a formação do OTB foi realizada utilizando o kit para placa de 24 poços denominado *bio-assembler* (662840, Greiner Bio-One). Resumidamente, a placa de 24 poços foi colocada sob o *drive* magnético de concentração do kit e incubada por 3 horas para promover o agrupamento das células e a formação organotípica. Após essa incubação inicial, o *drive* de concentração foi substituído pelo *drive* de levitação, mantendo os OTB

levitados em uma interface ar-líquido. Os OTB foram mantidos em cultura por 48 h antes da realização dos experimentos descritos a seguir.

3.3 Estimulação com a proteína Sp do SARS-CoV-2 e Ang II

A Sp trimérica recombinante do SARS-CoV-2 foi gentilmente fornecida pela Dra. Leda Castillo, do Laboratório de Engenharia e Cultura Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LECC/COPPE/UFRJ), e sintetizada conforme descrito anteriormente (Alvim *et al.*, 2022). Os OTBs foram pré-tratados com o antagonista do AT1R, losartana (LOS), por 2 horas; com o antagonista do MASR, A779, por 3 horas; com o agonista do MASR, AVE0991 (AVE), por 3 horas; ou com o ativador da ECA2, aceturato de diminazeno (DIZE), por 3 horas. A estimulação com Ang II (100 nM) foi realizada por 1 hora em OTBs não pré-tratados, e a sensibilização prévia com Ang II (100 nM) foi realizada por 1 hora após os pré-tratamentos, antes da estimulação com a proteína Sp (100 ng/mL). As concentrações selecionadas basearam-se em experimentos preliminares e na literatura publicada, conforme apresentado no **Quadro 1**. Assim, o presente estudo foi conduzido com os seguintes grupos experimentais: 1. Controle; 2. Sp; 3. A779 + Sp; 4. LOS + Sp; 5. DIZE + Sp; 6. AVE + Sp; 7. Ang II; 8. Ang II + Sp; 9. A779 + Ang II + Sp; 10. LOS + Ang II + Sp; 11. DIZE + Ang II + Sp; 12. AVE + Ang II + Sp

Quadro 1 – Concentrações dos compostos utilizados nos OTBs

Droga	Fabricante	Código	Concentração (µM)	Referência
LOS	Sigma-Aldrich®	SML3269	10	(Kim <i>et al.</i> , 2021)
A779	Sigma-Aldrich®	SML1370	0,1	(Geng <i>et al.</i> , 2021)
DIZE	Sigma-Aldrich®	D7770	0,1	(Li <i>et al.</i> , 2020)
AVE	Sigma-Aldrich®	SML2719	0,1	(Thiruvengataramani <i>et al.</i> , 2020)
Ang II	Sigma-Aldrich®	A9525	0,1	(Tawinwung; Ninsontia; Chanvorachote, 2015)

Fonte: Geng *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Tawinwung; Ninsontia; Chanvorachote, 2015; Thiruvengataramani *et al.*, 2020.

3.4 Análise da expressão gênica dos componentes do SRA por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).

As células pulmonares individuais foram cultivadas a uma densidade de 4×10^4 células/mL em placas de 24 poços. Todos os procedimentos a seguir foram realizados conforme o protocolo do fabricante. A extração de RNA total dos OTBs ou das células cultivadas individualmente foi realizada com o reagente TRIzol™ (15596026, Invitrogen™). Os pellets de RNA foram ressuspensos em água tratada com DEPC (750023, Invitrogen™), e a quantificação do RNA total foi realizada no espectrofotômetro Agilent BioTek Epoch (Agilent Technologies). Para eliminar possível contaminação por DNA genômico, as amostras foram tratadas com o kit DNase I (AMPD1, Sigma-Aldrich®). O cDNA foi sintetizado por transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (4387406, Applied Biosystems) e empregado em todas as reações. A RT-qPCR foi realizada utilizando ensaios TaqMan™ Gene Expression Assays pré-desenvolvidos (**Quadro 2**) e TaqMan™ Universal Master Mix II (4440038, Applied Biosystems), em um sistema StepOne™ Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems). A quantificação relativa foi realizada pelo método comparativo $2^{(-\Delta\Delta CT)}$, com a expressão dos genes-alvo normalizada pela Beta-Actina (ACTB).

Quadro 2 – Lista de ensaios inventariados TaqMan™ Gene Expression Assays

Alvo	Código
REN	Hs00982555_m1
AGT	Hs01586213_m1
ECA	Hs01104604_m1
ECA2	Hs01085333_m1

AT1R	Hs00258938_m1
AT2R	Hs02621316_s1
MASR	Hs00267157_s1
ACTB	Hs01060665_g1

Fonte: Thermo Fisher Scientific, [S.d.]

3.5 Quantificação da liberação de citocinas por ELISA sanduíche

Os sobrenadantes da cultura celular dos OTBs foram coletados e armazenados a -80°C até a análise. A quantificação das citocinas pró-inflamatórias foi realizada com kits comerciais DuoSet® ELISA para humanos, conforme as instruções do fabricante. A absorbância a 450 nm foi medida em um leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices). As concentrações de citocinas foram determinadas a partir de curvas-padrão e expressas em picogramas por mililitro (pg/mL).

3.6 Histologia e imunohistoquímica de fluorescência

A histologia e a imuno-histoquímica (IHC) dos OTBs foram realizadas conforme descrito anteriormente. As secções destinadas à IHC foram incubadas durante a noite a 4°C com um dos seguintes anticorpos primários: AT1R (sc-515884, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), MASR (sc-390453, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), ECA2 (sc-390851, Santa Cruz Biotechnology, 1:100), laminina (ABM412, Invitrogen™, 1:50), citoqueratina-19 (PA5-95304, Invitrogen™, 1 $\mu\text{g/mL}$), α -actina de músculo liso (14-9760-82, Invitrogen™, 1:500), fibronectina (PA5-29578, Invitrogen™, 1:1000) ou FGF-2 (SC-1360, Santa Cruz Biotechnology, 1:100). Os controles negativos foram incubados com a solução de bloqueio. Subsequentemente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor™ 488 (A-11017, Invitrogen™, 1:1000). Fluoroshield™ com DAPI (F6057, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para coloração nuclear e montagem das lâminas. As imagens foram adquiridas com um microscópio de fluorescência (BX53, Olympus). Antes da análise, a fluorescência de fundo foi medida em uma região de interesse livre de células e subtraída da

intensidade total de fluorescência de cada secção, utilizando o software ImageJ versão 1.54g. O brilho das imagens foi uniformemente aumentado em todas as secções para melhorar a visualização. A intensidade de fluorescência entre as diferentes secções foi avaliada qualitativamente e representada como: + (baixa marcação), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa).

3.7 Análise estatística

Os dados apresentados nos gráficos de barras são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Após a avaliação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro–Wilk, foi aplicada uma ANOVA de uma via paramétrica, seguida pelo teste *post hoc* de Sidak, para comparações entre múltiplos grupos. A significância estatística foi definida como $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism® versão 9.0 para Windows (GraphPad Software Inc.).

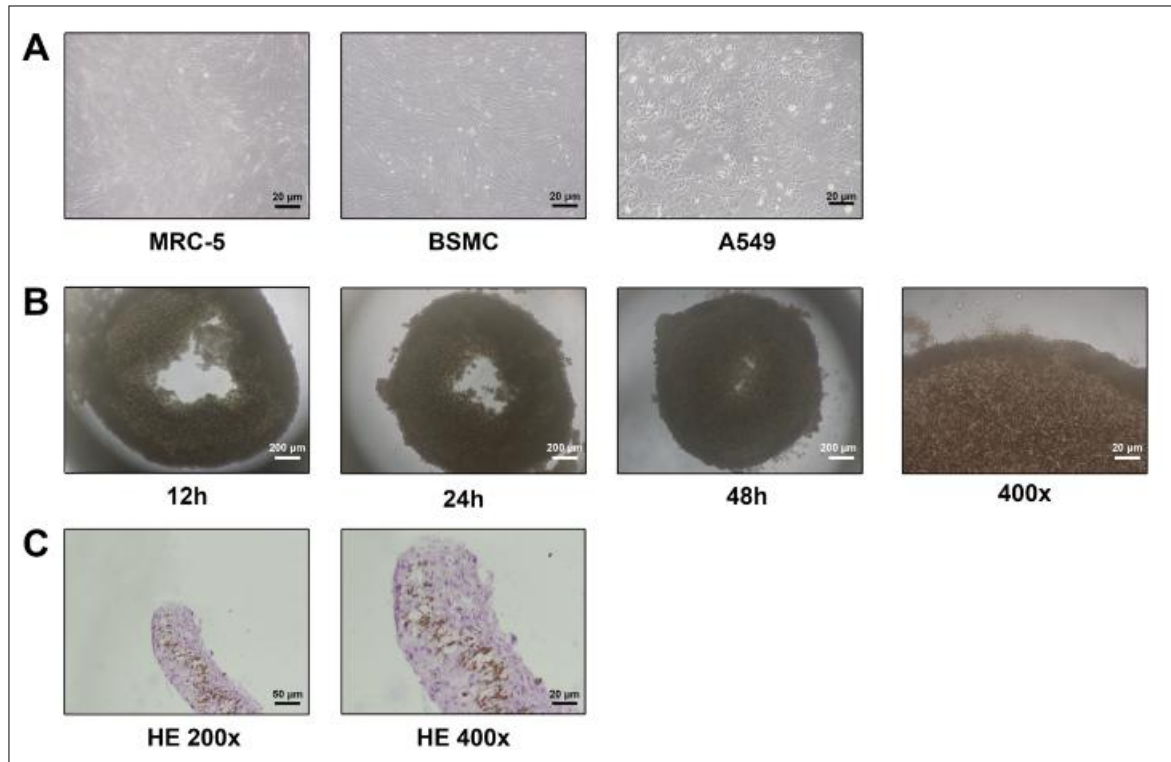
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização morfológica dos OTBs

A cultura bidimensional dos três tipos celulares que compõem a co-cultura utilizada para formar o OTB — MRC-5, BSMC e A549 — é apresentada antes da montagem do organoide (Figura 4A). Observa-se a formação de um organoide após 12 h, 24 h e 48 h da montagem da co-cultura e, visualmente, há uma redução progressiva do lúmen central e um aumento da compactação concêntrica ao longo do tempo (Figura 4B). Nota-se também que, após a primeira troca de meio (imediatamente antes da captura da imagem de 24 h), o agrupamento de células desprendidas ao redor do organoide, visível no canto superior esquerdo da micrografia de 12 h, foi removido (Figura 4B). Intercaladas entre os três tipos celulares, observam-se partículas NanoShuttle distribuídas por toda a estrutura, especialmente na ampliação de 400x (Figura 4B). Na Figura 4b, é apresentada a secção longitudinal do OTB corada com hematoxilina e eosina (H&E), em ampliações de 200x e 400x. A

presença das partículas NanoShuttle também é visível como depósitos marrom-escuros.

Figura 4 – Caracterização morfológica dos OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

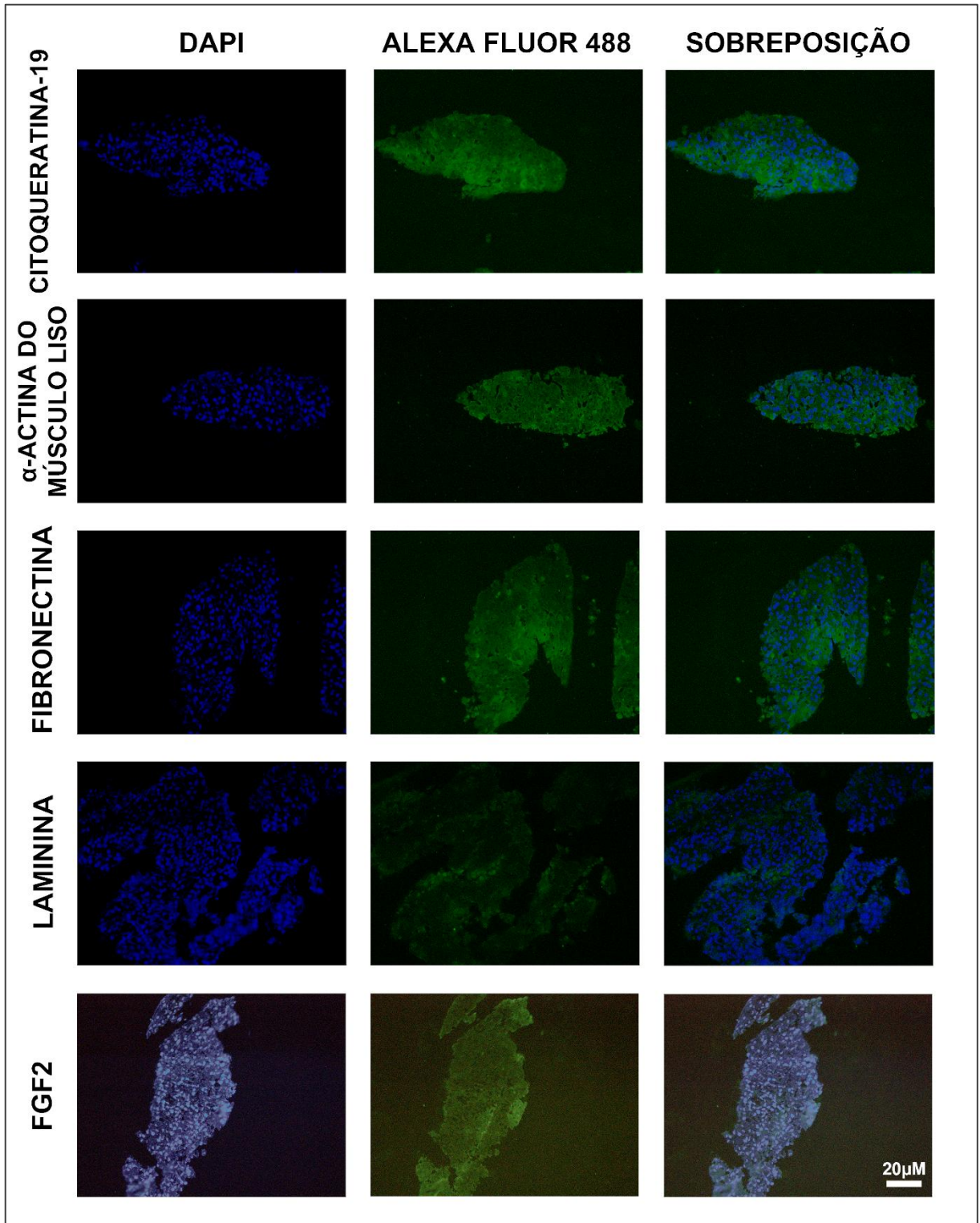
Legenda: (A) Microscopia de contraste de fase das células pulmonares humanas MRC-5, BSMC e A549 crescendo em monocamada bidimensional. Imagem capturada com microscópio invertido de contraste de fase em aumento de 100x (A). OTB sob LM em diferentes tempos após a montagem; cada organoide é composto por 1×10^5 células de cada tipo celular apresentado em "A" (B). Coloração por hematoxilina e eosina (H&E) de uma secção transversal de um organoide incluído em parafina, capturada por microscopia de campo claro em aumentos de 200x e 400x, respectivamente (C). Barras de escala: "A": 20 µm; "B": 12 h, 24 h e 48 h: 200 µm e 400x: 20 µm; "C": H&E 200x: 50 µm e H&E 400x: 20 µm.

4.2 Marcadores fenotípicos de células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos pulmonares em OTBs

Para verificar a identidade e a organização espacial das populações celulares e dos componentes da matriz extracelular no organoide, foi realizada imunomarcagem de alvos endógenos representativos de cada linhagem celular e de proteínas típicas

da matriz (Figura 5). Foram observadas marcações positivas para citoqueratina-19, uma proteína característica das células A549; α -actina de músculo liso, característica das BSMCs; e FGF-2, um marcador dos fibroblastos MRC-5. Esses marcadores revelaram uma distribuição espacial heterogênea de cada população celular, com células agrupadas em regiões distintas dos organoides. Em nosso modelo experimental, os componentes da matriz extracelular incluíram fibronectina e laminina. A laminina apresentou menor intensidade de fluorescência, mas permaneceu uniformemente distribuída em todo o organoide, enquanto a marcação para fibronectina esteve concentrada em áreas específicas.

Figura 5 – Marcadores fenotípicos de células epiteliais, células musculares lisas e fibroblastos pulmonares nos OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

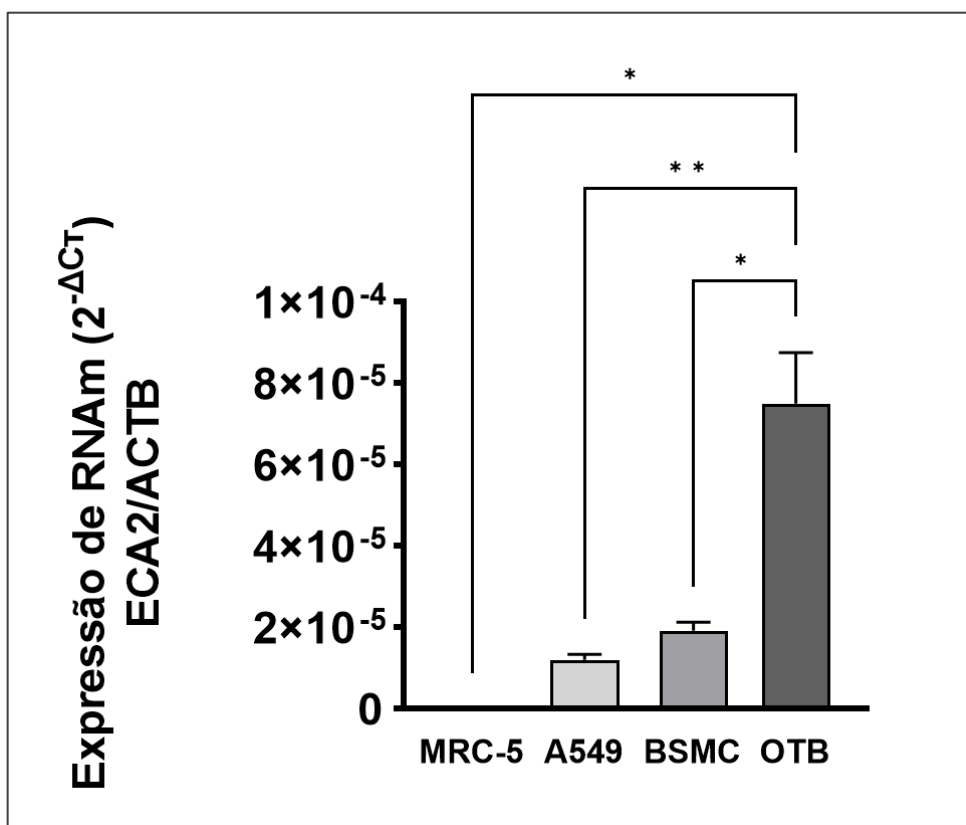
Legenda: A imuno-histoquímica fluorescente foi realizada 48 horas após a formação do organoide. A marcação verde representa as proteínas-alvo, enquanto a marcação azul corresponde aos núcleos celulares. Todas as imagens foram capturadas em aumento de 400 $\times$. A composição da figura foi realizada utilizando o Adobe Photoshop CS6. O brilho das imagens foi aumentado de forma igual em todas as lâminas para melhorar a visualização.

Barra de escala: 20 μ m.

4.3 O RNAm de ECA2 é mais expresso nos OTBs do que nas células pulmonares individuais

Embora o sistema respiratório seja o principal alvo da infecção pelo SARS-CoV-2, o principal receptor viral, o ECA2, é pouco expresso em diversos tipos celulares pulmonares. As células MRC-5 não expressaram RNAm de ECA2; as células A549 e BSMC expressaram quantidades relativamente baixas, enquanto os OTBs expressaram níveis significativamente mais altos de ECA2 do que os demais tipos celulares (Figura 6).

Figura 6 – Expressão basal de RNAm de ECA2 em diferentes linhagens celulares

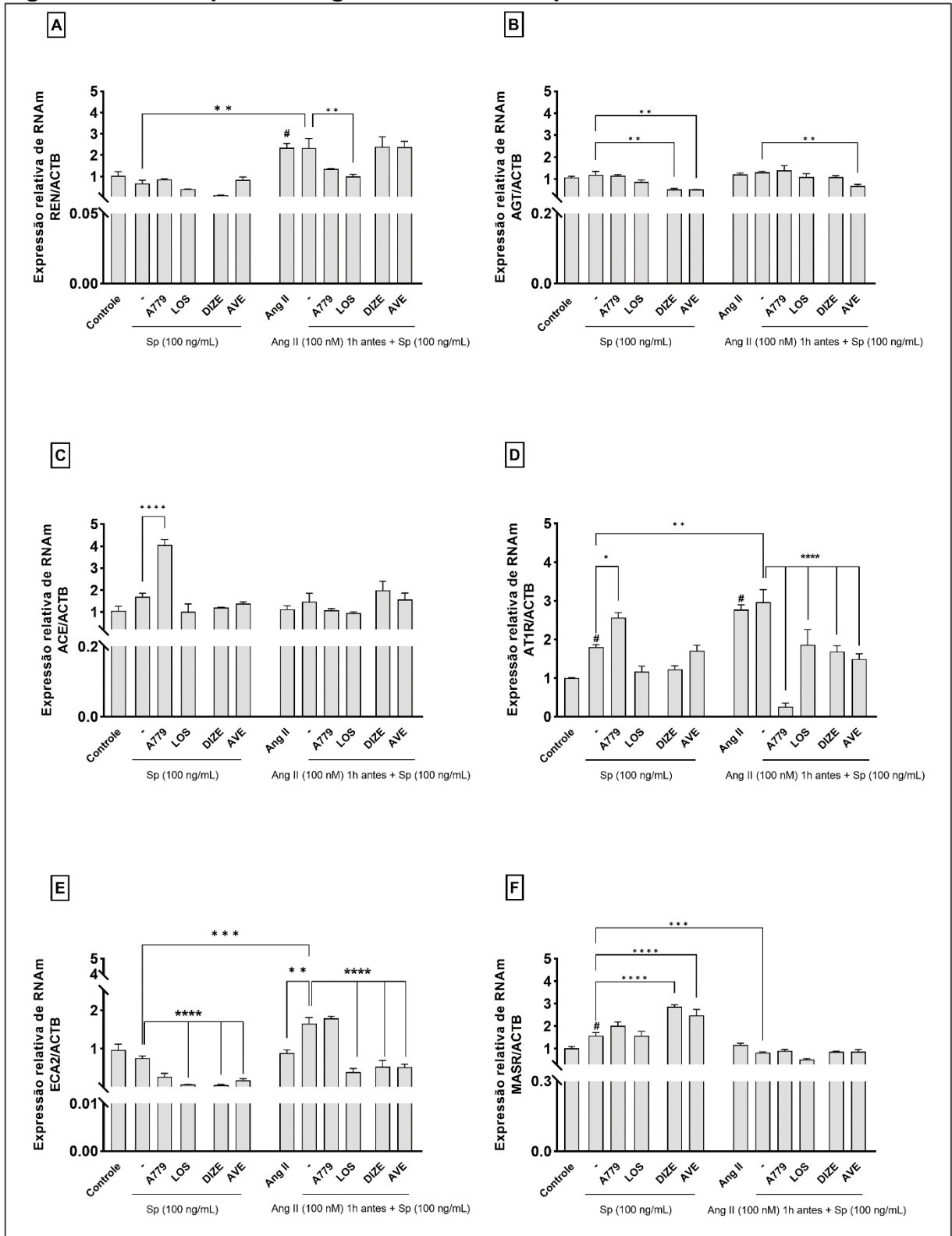


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: A RT-qPCR foi realizada para quantificar a expressão nas linhagens celulares MRC-5, A549 e BSMC, bem como nos organoides OTB. Os gráficos de barras representam média $\pm$ SEM. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Diferenças significativas são indicadas por * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$.

4.4 O OTB expressa componentes do SRA, e a Ang II regula a expressão desses componentes induzida pela Sp

Para investigar os mecanismos subjacentes às respostas do SRA à estimulação por Sp nos OTBs, avaliamos a expressão gênica de seus principais componentes sob diferentes pré-tratamentos com fármacos moduladores do SRA. Os OTBs expressaram RNAm dos componentes do SRA necessários à síntese endógena de Ang II (Figura 7). Também avaliamos o AT2R, porém, não foi detectado (dados não apresentados). A estimulação apenas com Sp induziu aumentos na expressão de AT1R e MASR (Figuras 7D e 7F), mas não afetou a expressão de RNAm de REN, AGT, ECA ou ECA2 (Figuras 7A–7C e 7E). Em comparação com o estímulo apenas com Sp, os pré-tratamentos apresentaram os seguintes efeitos: A779 aumentou a expressão de ECA e AT1R (Figuras 7C e 7D), mas não alterou REN, AGT, ECA2 e MASR (Figuras 7A, 7B, 7E e 7F). O RNAm de ECA2 foi negativamente afetado pelos LOS (Figura 7E), mas não foi influenciado pelos demais componentes. DIZE reduziu a expressão de AGT e ECA2 (Figuras 7B e 7E), mas aumentou a expressão de MASR (Figura 7F), sem modular a expressão dos demais genes avaliados. AVE atenuou a expressão gênica de AGT, enquanto aumentou a de MASR (Figuras 7B e 7F), mas não afetou os demais componentes do SRA (Figuras 7A, 7C, 7D e 7E). A estimulação apenas com Ang II aumentou a expressão de RNAm de REN e AT1R (Figuras 7A e 7D), mas não afetou a expressão de AGT, ECA, ECA2 e MASR (Figuras 7B, 7C, 7E e 7F). A sensibilização com Ang II por 1 hora antes da estimulação com Sp, em comparação com o grupo Sp, aumentou a expressão de REN, AT1R e ECA2 (Figuras 7A, 7D e 7E) e reduziu a expressão de MASR (Figura 7F), mas não afetou a expressão de AGT e de ECA (Figuras 7B e 7C). Em comparação com a sensibilização com Ang II 1 hora antes de Sp, os pré-tratamentos apresentaram os seguintes resultados: A779 reduziu a expressão de RNAm de AT1R (Figura 7D), mas não alterou os demais genes analisados (Figuras 7A–7C e 7E–7F). LOS reduziu a expressão de REN, ECA2 e AT1R (Figuras 7A, 7D e 7E), mas não regulou AGT, ECA e MASR (Figuras 7B, 7C e 7F). DIZE reduziu a expressão de AT1R e ECA2 (Figuras 7D e 7E), sem afetar REN, AGT, ECA e MASR (Figuras 7A–7C e 7F). Por fim, AVE reduziu a expressão de AGT, AT1R e ECA2 (Figuras 7B, 7D e 7E), sem alterar a expressão de REN, ECA e MASR (Figuras 7A, 7C e 7F).

Figura 7 – Expressão gênica dos componentes do SRA em OTBs

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Os OTBs foram pré-tratados com A779, LOS, AVE ou DIZE (0,1 μ M, 10 μ M, 0,1 μ M e 0,1 μ M, respectivamente) por 2 h (A779 e LOS) ou 3 h (AVE e DIZE), seguidos da adição da proteína Sp do SARS-CoV-2 (100 ng/mL). Grupos adicionais receberam apenas estimulação com Ang II (100 nM) ou estimulação com Ang II (100 nM) após os pré-

tratamentos, 1 hora antes da estimulação com Sp. A expressão de RNAm de REN (A), AGT (B), ECA (C), AT1R (D), ECA2 (E) e MASR (F) foi analisada por RT-qPCR 6 horas após a estimulação com Sp. Os gráficos de barras representam média $\pm$ SEM de 3–5 organoides. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. Diferenças em relação ao controle são indicadas por #($p \leq 0,05$), e diferenças entre os demais grupos de tratamento são indicadas por * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

4.5 Regulação dos níveis proteicos de AT1R, ECA2 e MASR sob condições de estímulo com Sp e modulação pela Ang II

Com base nos padrões transcricionais observados em nossas análises de qPCR, avaliamos, em seguida, se essas tendências também estavam presentes no nível proteico. Para isso, analisamos a regulação dos três principais componentes envolvidos no SRA sob as mesmas condições de pré-tratamento e estimulação. Um resumo das diferenças na marcação por fluorescência é apresentado no **Quadro 3**. Todos os grupos controle foram classificados como apresentando marcação leve (++). Em relação ao AT1R, a estimulação com Sp resultou em marcação intensa (++++). Ao mesmo tempo, os OTBs pré-tratados com A779, LOS e DIZE apresentaram marcação leve (++) , semelhante à do controle (Figura 8). A estimulação com Ang II promoveu marcação moderada (+++), a mesma observada nos OTBs sensibilizados com Ang II 1 hora antes do estímulo com Sp (Figura 8). Quanto aos grupos pré-tratados com moduladores do SRA antes da sensibilização com Ang II e Sp, LOS, DIZE e AVE promoveram marcação moderada (+++) para o AT1R, enquanto A779 induziu marcação intensa (++++) (Figura 8). Em relação à ECA2, a estimulação com Sp resultou em marcação baixa (+), mesmo após os pré-tratamentos com LOS, DIZE e AVE, exceto para A779, que apresentou marcação leve (++) , semelhante à do controle (Figura 9). A estimulação com Ang II promoveu marcação baixa (+), a mesma observada nos OTBs sensibilizados com Ang II 1 hora antes do estímulo com Sp (Figura 9). Quanto aos grupos pré-tratados com moduladores do SRA antes da sensibilização com Ang II e Sp, A779, DIZE e AVE promoveram marcação baixa (+) para ECA2, enquanto LOS induziu marcação leve (++) (Figura 9). Por fim, para o MASR, a estimulação com Sp resultou em marcação leve (++) , assim como o controle (Figura 10), enquanto os OTBs pré-tratados com LOS e DIZE apresentaram marcação moderada (+++); A779 apresentou marcação baixa (+); e AVE apresentou marcação intensa (++++) (Figura 10). A estimulação com Ang II promoveu marcação leve (++) ,

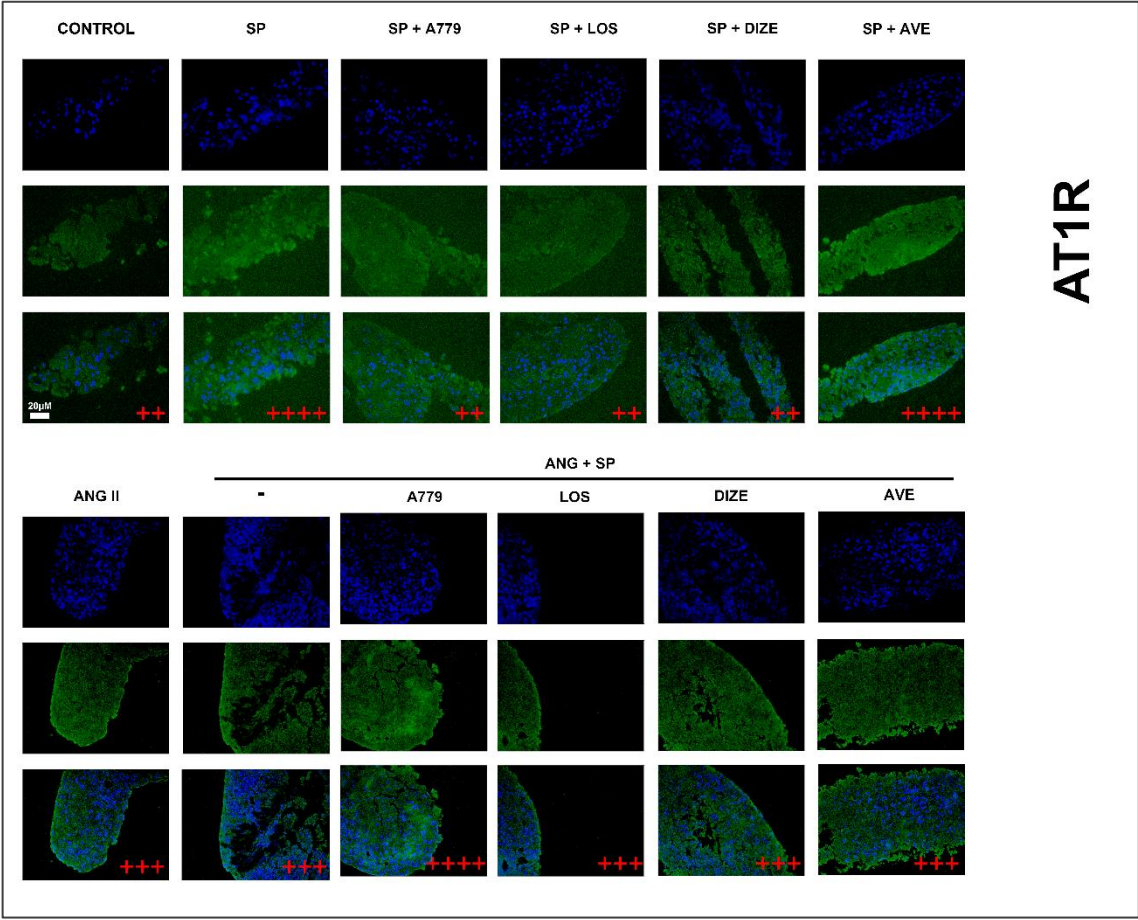
a mesma observada nos OTBs sensibilizados com Ang II 1 hora antes do estímulo com Sp (Figura 10). Quanto aos grupos pré-tratados com moduladores do SRA antes da sensibilização com Ang II e Sp, A779 e AVE promoveram marcação baixa (+); DIZE, marcação leve (++); e LOS, marcação intensa (++++). (Figura 10).

Quadro 3 – Resumo da intensidade qualitativa de imunofluorescência de AT1R, ECA2 e MASR em OTBs. A intensidade de fluorescência foi classificada em: + (marcação baixa), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa).

Grupos	AT1R	ECA2	MASR
Controle	++	++	++
Sp	++++	+	++
Sp + A779	++	++	+
Sp + LOS	++	+	+++
Sp + DIZE	++	+	+++
Sp + AVE	++++	+	++++
Ang II	+++	+	++
Ang II + Sp	+++	+	++
Ang II + A779 + Sp	++++	+	+
Ang II + LOS + Sp	+++	++	++++
Ang II + DIZE + Sp	+++	+	++
Ang II + AVE + Sp	+++	+	+

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

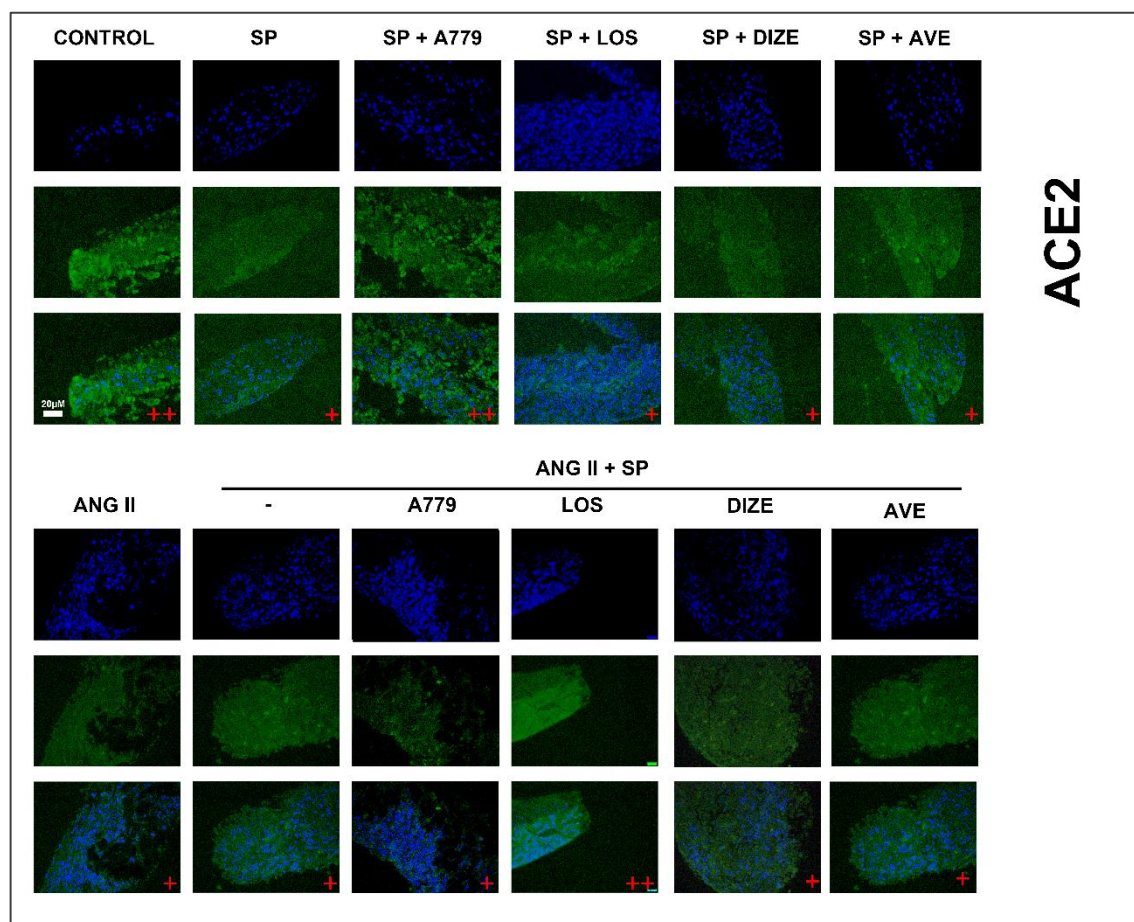
Figura 8 – Expressão proteica de AT1R em OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Os OTBs foram pré-tratados com A779, LOS, AVE ou DIZE (0,1 μM, 10 μM, 0,1 μM e 0,1 μM, respectivamente) por 2 h (A779 e LOS) ou 3 h (DIZE e AVE), seguidos pela adição da proteína Sp do SARS-CoV-2 (100 ng/mL). Grupos adicionais receberam apenas estimulação com Ang II (100 nM) ou estimulação com Ang II (100 nM) após os pré-tratamentos, 1 hora antes da estimulação com Sp. A intensidade média de fluorescência de AT1R foi analisada qualitativamente como: + (marcação baixa), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa). O brilho das imagens foi aumentado de forma igual em todas as lâminas para melhorar a visualização. Barra de escala: 20 μm.

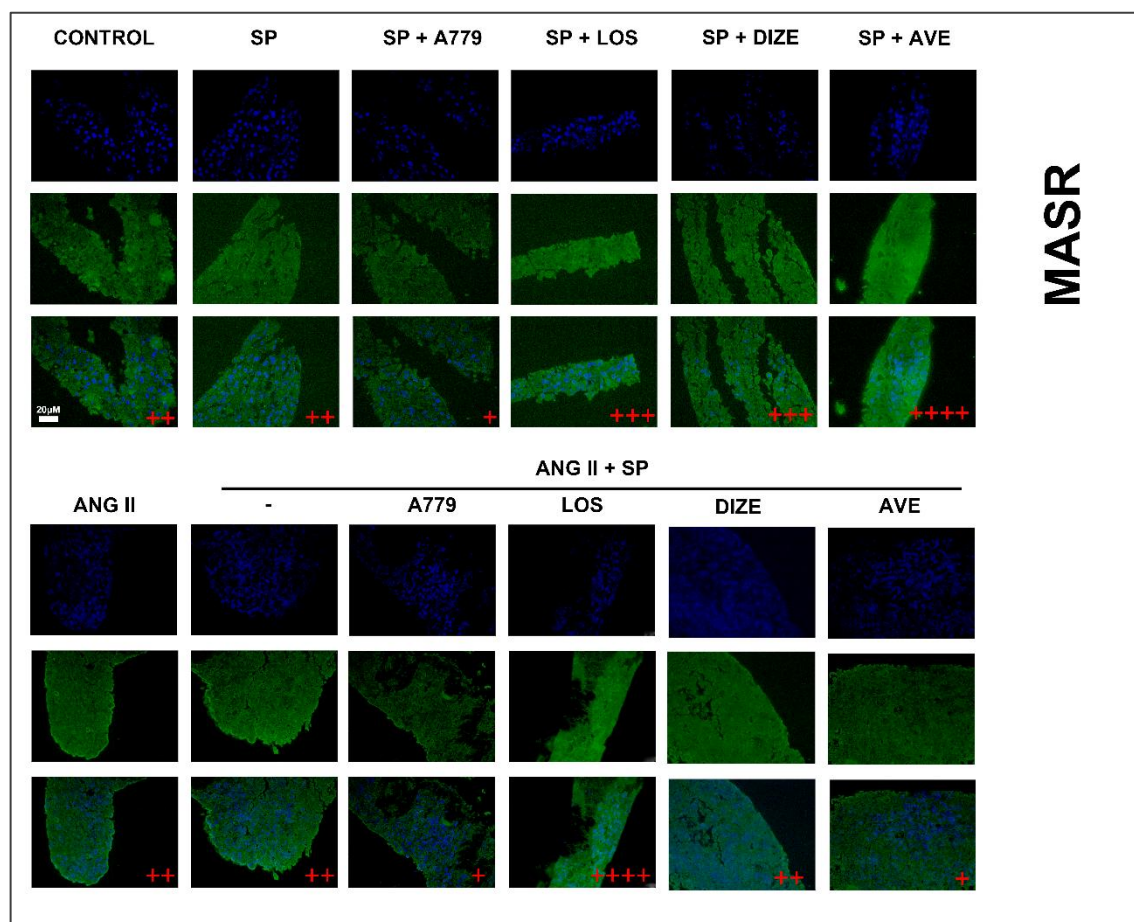
Figura 9 – Expressão proteica de ECA2 em OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Os OTBs foram pré-tratados com A779, LOS, AVE ou DIZE (0,1 µM, 10 µM, 0,1 µM e 0,1 µM, respectivamente) por 2 h (A779 e LOS) ou 3 h (DIZE e AVE), seguidos pela adição da proteína Sp do SARS-CoV-2 (100 ng/mL). Grupos adicionais receberam apenas estimulação com Ang II (100 nM) ou estimulação com Ang II (100 nM) após os pré-tratamentos, 1 hora antes da estimulação com Sp. A intensidade média de fluorescência de ECA2 foi analisada qualitativamente como: + (marcação baixa), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa). O brilho das imagens foi aumentado de forma igual em todas as lâminas para melhorar a visualização. Barra de escala: 20 µm.

Figura 10 – Expressão proteica de MASR em OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

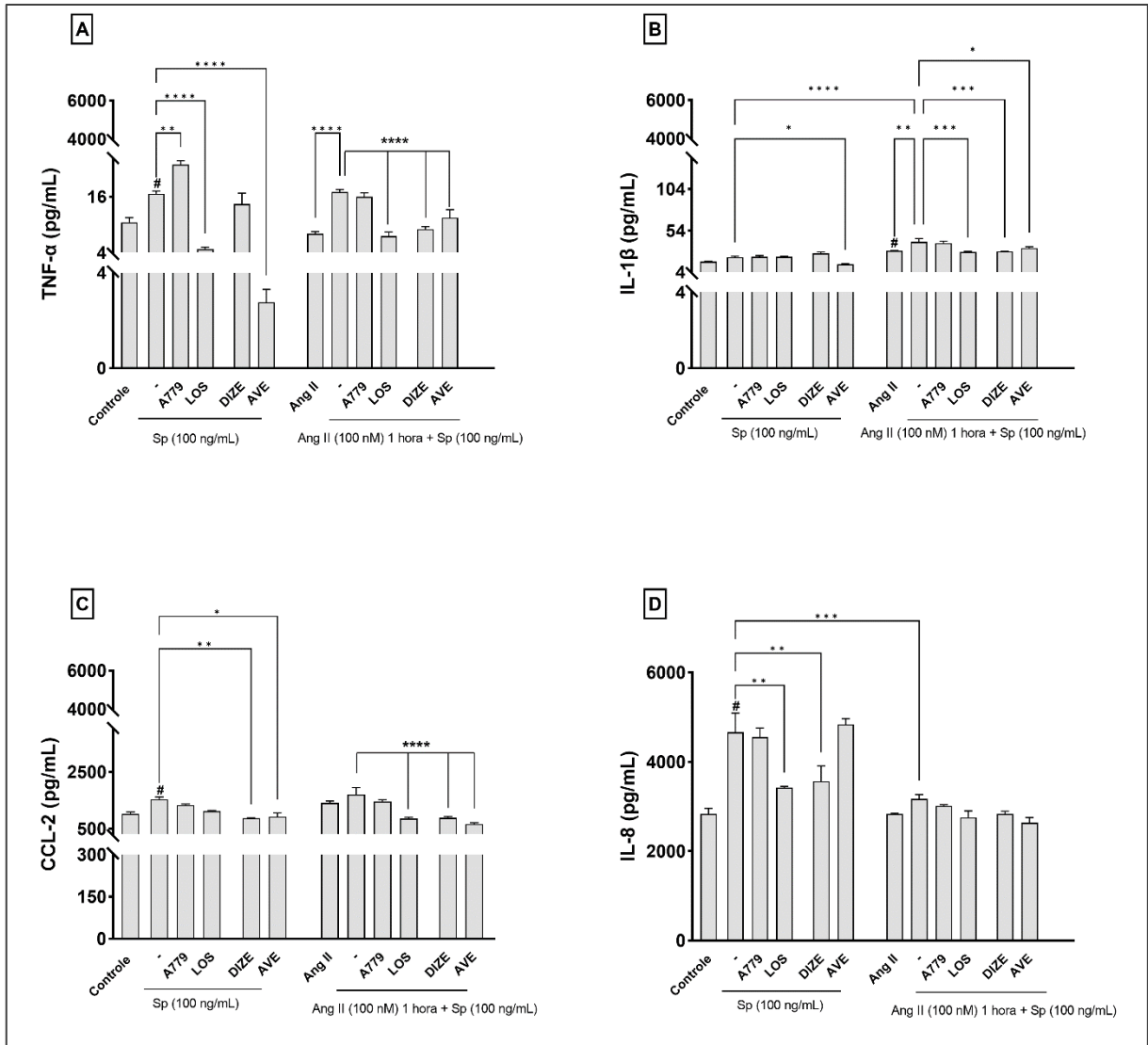
Legenda: Os OTBs foram pré-tratados com A779, LOS, AVE ou DIZE (0,1 μM, 10 μM, 0,1 μM e 0,1 μM, respectivamente) por 2 h (A779 e LOS) ou 3 h (DIZE e AVE), seguidos pela adição da proteína Sp do SARS-CoV-2 (100 ng/mL). Grupos adicionais receberam apenas estimulação com Ang II (100 nM) ou estimulação com Ang II (100 nM) após os pré-tratamentos, 1 hora antes da estimulação com Sp. A intensidade média de fluorescência de MASR foi analisada qualitativamente como: + (marcação baixa), ++ (marcação leve), +++ (marcação moderada) e ++++ (marcação intensa). O brilho das imagens foi aumentado de forma igual em todas as lâminas para melhorar a visualização. Barra de escala: 20 μm.

4.6 Os OTBs estimulados com Sp expressam e liberam citocinas inflamatórias

A estimulação com Sp aumentou a liberação de TNF-α, CCL-2 e IL-8, mas não de IL-1β, quando comparada ao grupo controle (Figura 11A-D). Em relação aos grupos que receberam pré-tratamento antes do estímulo com Sp: A779 aumentou a liberação de TNF-α (Figura 11A), mas não afetou a liberação das demais citocinas. LOS atenuou a liberação de TNF-α e IL-8 (Figuras 11A e 11D), mas não alterou a de nenhuma outra citocina. DIZE reduziu a liberação de IL-8 e CCL-2 (Figura 11D), mas

não de TNF- α e IL-1 β , enquanto AVE diminuiu a liberação de TNF- α , IL-1 β e CCL-2 (Figura 11A), mas não de IL-8. Em relação ao grupo estimulado apenas com Ang II, em comparação com o controle, houve aumento apenas na liberação de IL-1 β (Figura 11B), sem efeito sobre as demais citocinas. A sensibilização com Ang II por 1 hora antes da estimulação com Sp aumentou a liberação de TNF- α em comparação com o grupo que recebeu apenas Ang II (Figura 11B), enquanto a liberação de IL-1 β foi maior do que no grupo estimulado apenas com Sp (Figura 11B). Quanto aos grupos pré-tratados com moduladores do SRA antes da sensibilização com Ang II, 1 hora antes de Sp, A779 não induziu alterações na liberação de citocinas (Figura 11), LOS reduziu TNF- α , IL-1 β e CCL-2 (Figuras 11A-C), mas não IL-8 (Figura 11D), enquanto DIZE e AVE diminuíram a liberação de TNF- α , IL-1 β e CCL-2 (Figuras 11A-C), mas não de IL-8 (Figura 11D).

Figura 11 – Expressão de citocinas inflamatórias em OTBs



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Legenda: Os OTBs foram pré-tratados com A779, LOS, AVE ou DIZE (0,1 μ M, 10 μ M, 0,1 μ M e 0,1 μ M, respectivamente) por 2 horas (A779 e LOS) ou 3 horas (DIZE e AVE), seguidos pela adição da proteína Sp do SARS-CoV-2 (100 ng/mL). Grupos adicionais receberam apenas estimulação com Ang II (100 nM) ou sensibilização com Ang II (100 nM) após os pré-tratamentos, 1 hora antes da estimulação com Sp. As concentrações de TNF- α (A), IL-1 β (B), CCL-2 (C) e IL-8 (D) foram medidas no sobrenadante de cultura celular 6 horas após a estimulação com Sp. Os gráficos de barras representam a média de pelo menos 3 organoides $\pm$ SEM. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Sidak. Diferenças em relação ao controle são indicadas por # ($p \leq 0,05$), e diferenças entre os grupos de tratamento são indicadas por * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

Desde o início da pandemia de 2020, intensos esforços de pesquisa têm se concentrado na glicoproteína Sp, devido ao seu papel central na mediação da entrada do SARS-CoV-2 nas células. Nossos resultados demonstraram a montagem bem-sucedida de um modelo tridimensional de organoide de bronquíolo, gerado a partir de uma co-cultura de células pulmonares humanas, capaz de produzir componentes locais do SRA. Os OTBs responderam à proteína Sp, regulando positivamente a expressão gênica de AT1R e MASR, bem como a das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-8 e CCL-2, enquanto a expressão proteica de ECA2 foi reduzida. Apenas a estimulação com Ang II foi capaz de aumentar o RNAm de REN e AT1R e a liberação de IL-1 β e, quando adicionada 1 hora antes da Sp, alterou as respostas dos OTBs à Sp, aumentando a expressão gênica de ECA2 e diminuindo a do MASR, em relação ao grupo estimulado apenas com Sp.

Diversos fatores dificultam os estudos laboratoriais da COVID-19, incluindo a escassez de modelos *in vitro* adequados e as limitações associadas ao uso de animais, devido a questões éticas e à necessidade de trabalhar sob rigorosas condições de biossegurança (Seixas *et al.*, 2023). Nesse contexto, modelos pulmonares 3D têm-se estabelecido como ferramentas valiosas para o estudo do SARS-CoV-2 (Han *et al.*, 2022). Considerando isso, optamos por utilizar um modelo de bronquíolo para investigar se a Ang II modula as respostas induzidas pela proteína Sp, com foco especial no equilíbrio entre os eixos inflamatório e anti-inflamatório do SRA.

A REN é uma enzima fundamental dentro do SRA, ela inicia as sequenciais reações catalíticas dentro do sistema pela conversão de AGT em Ang I. Observamos que o estímulo com Sp não alterou os níveis de RNAm de REN, sugerindo que a proteína Sp não regula a expressão desse gene nos OTBs. Em contrapartida, a expressão gênica de REN aumentou tanto no grupo estimulado apenas com Ang II quanto no grupo previamente sensibilizado com Ang II. Estudos anteriores mostraram que a Ang II é capaz de aumentar a expressão de REN em células endoteliais e em células tubulares renais (Gonzalez *et al.*, 2011; Ide *et al.*, 2008); porém, até onde sabemos, somos os primeiros a demonstrar que a Ang II regula positivamente a REN em células pulmonares. Supomos que a Ang II, ao sustentar a liberação de citocinas no pulmão por meio da ativação do AT1R, possa, indiretamente, aumentar a expressão de REN. Nesse sentido, já foi demonstrado que células epiteliais

pulmonares elevam a expressão de REN em resposta a estímulos inflamatórios (Ye; Liu, 2020). Dessa forma, o aumento da expressão de REN poderia intensificar a atividade local do SRA durante a inflamação induzida pela Sp, favorecendo a produção local de Ang II. Ademais, a ausência de efeitos significativos dos pré-tratamentos com AVE e DIZE sobre a expressão de REN sugere que o MASR não participa da regulação desse gene no contexto da estimulação por Sp.

O AGT é o substrato inicial do SRA; além de seu papel sistêmico, é expresso localmente por diferentes células fora do fígado, incluindo células epiteliais alveolares e miofibroblastos pulmonares (Li *et al.*, 2006). De fato, a elevação da transcrição de AGT pode ser considerada um evento significativo em processos patogênicos como a fibrose pulmonar, por contribuir para o aumento local de Ang II (Uhal *et al.*, 2012). Nesse sentido, já foi demonstrado ativação do AT1R pela Ang II, é capaz de induzir a produção de AGT em células musculares lisas vasculares, por meio da via NF- κ B e Rho quinase (Miyata *et al.*, 2014; Ruiz-Ortega *et al.*, 2000). Similarmente, citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , também podem estimular a expressão de AGT (Uhal *et al.*, 2012).

No contexto da COVID-19, o AGT já foi apontado como fator de risco para a doença, e alguns alelos específicos podem estar correlacionados a um grau maior de gravidade (Kouhpayeh *et al.*, 2021). Além disso, a concentração de AGT é mais elevada no soro de pacientes com a forma mais grave da doença (Tepasse *et al.*, 2022). Entretanto, em nosso estudo *in vitro* não observamos alterações na expressão de RNAm de AGT em resposta à estimulação por Sp e/ou Ang II. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de nossas análises terem sido realizadas na fase aguda da resposta celular (6 horas). No entanto, a sinalização do MASR regulou negativamente os níveis de RNAm de AGT nos OTBs sob estímulo com Sp, uma vez que os pré-tratamentos com DIZE e AVE reduziram a expressão de AGT. Estudos anteriores demonstraram que o TGF- β 1 pode aumentar a expressão de AGT em células tubulares renais e fibroblastos pulmonares (Abdul-Hafez; Shu; Uhal, 2009; Brezniceanu *et al.*, 2006); em contrapartida, a expressão de TGF- β 1 pode ser reduzida pelo MASR por meio da Ang 1-7 (Zhang *et al.*, 2015). Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a ativação do MASR pode reduzir a transcrição de AGT sob estimulação com Sp. Uma explicação plausível para esse efeito é que a diminuição da expressão de TGF- β 1, induzida pela ativação do MASR, reduz a

expressão basal de AGT. Embora essa hipótese necessite de confirmação adicional, uma vez que o bloqueio do MASR com A779 não alterou a expressão de AGT, o que sugere que a sinalização basal desse receptor pode ser insuficiente para modificar a expressão de AGT. No grupo sensibilizado com Ang II antes da exposição à Sp, apenas o efeito inibitório do AVE sobre a transcrição de AGT permaneceu, mas não o do DIZE, indicando que a sinalização via MASR continua exercendo um efeito inibitório sobre AGT mesmo na presença de Ang II. Esses achados sugerem que a ativação do MASR pode limitar a disponibilidade local de Ang II por meio da redução da expressão de AGT.

A estimulação com Sp não alterou significativamente a expressão constitutiva do RNAm da ECA, indicando que os efeitos induzidos pela Sp sobre o SRA ocorrem independentemente da regulação transcricional dessa enzima. Notavelmente, sob estímulo com Sp, o bloqueio do MASR com A779 aumentou a expressão de ECA, um efeito que não foi observado nos OTBs sensibilizados com Ang II. Isso sugere que a sinalização basal do MASR pode exercer um efeito inibitório sobre a transcrição da ECA, a qual é suprimida pela sinalização da Ang II. Embora esse mecanismo ainda precise ser melhor investigado, seu impacto parece limitado, uma vez que a ativação do MASR por AVE ou DIZE não modificou a transcrição da ECA.

Embora o AT1R seja essencial para a regulação homeostática da pressão arterial, ele tem sido fortemente associado à inflamação nas vias aéreas e a doenças pulmonares, incluindo a COVID-19 (Ashour, 2022; Braga *et al.*, 2025; Gupta *et al.*, 2021; Yue *et al.*, 2022). Por meio dele, já foi demonstrado que Ang II é capaz de modular interações entre a Sp e outros receptores além da ECA2, aumentando, por exemplo, a afinidade de ligação da Sp ao receptor tirosina-quinase AXL, abundantemente expresso em células respiratórias com baixa expressão de ECA2 (Oliveira *et al.*, 2025). Paralelamente, a Ang IV, um peptídeo derivado da Ang II, também pode aumentar a ligação da Sp à ECA2, favorecendo a entrada viral (Gagliardi *et al.*, 2025; Oliveira *et al.*, 2025). Em concordância com nossos resultados, já foi demonstrado que a proteína Sp aumenta indiretamente a expressão de AT1R ao inibir a expressão da proteína de membrana ECA2, elevando, conseqüentemente, a produção endógena de Ang II, que é capaz de induzir a expressão de AT1R por autorregulação positiva (Gong *et al.*, 2023; Patra *et al.*, 2020).

Observamos uma intensa marcação fluorescente da proteína AT1R quando os OTBs foram estimulados com Sp. Quando o pré-tratamento com LOS foi realizado, observou-se apenas uma discreta marcação no AT1R. De forma semelhante, embora sem significância estatística, observou-se uma tendência de redução na expressão gênica de AT1R ($p=0,13$). Além disso, apesar dos pré-tratamentos com DIZE e AVE não terem alterado significativamente a expressão de AT1R, o A779 potencializou o aumento de AT1R induzido pela Sp, sugerindo que a sinalização basal do MASR pode restringir a transcrição do RNAm de AT1R. Sabe-se que AT1R e MASR podem ser coexpressos e se associar, formando heterodímeros localizados na membrana celular (Kostenis *et al.*, 2005; Rivas-Santisteban *et al.*, 2021). Essa associação física entre os receptores exerce um efeito negativo sobre a sinalização do AT1R, atuando como um mecanismo de modulação antagônica (Burghi *et al.*, 2019; Rivas-Santisteban *et al.*, 2021). Dessa forma, a ativação basal do MASR provavelmente inibe a ativação do AT1R, impedindo sua autorregulação positiva por meio da ligação à Ang II.

A estimulação com Ang II aumentou tanto a expressão gênica quanto a marcação fluorescente de AT1R. Quando a Sp foi adicionada após a sensibilização com Ang II, o aumento de AT1R foi ainda maior do que o observado com Sp isoladamente. Esse resultado indica que a Ang II pré-condiciona as células dos OTBs e, em seguida, amplifica a resposta dessas células à Sp. De fato, o pré-tratamento com LOS reduziu o aumento da expressão do RNAm de AT1R induzido pela Ang II e Sp. Da mesma forma, os pré-tratamentos com AVE e DIZE reduziram a expressão gênica de AT1R nos grupos sensibilizados com Ang II, provavelmente por meio da ativação do MASR, exercendo, assim, um efeito antagônico sobre a sinalização do AT1R e inibindo sua autorregulação positiva.

Em contraste com a resposta observada ao pré-tratamento com A779 sob o estímulo apenas com Sp, em que houve aumento da expressão de RNAm de AT1R, o grupo tratado com A779 e previamente sensibilizado com Ang II antes da exposição à Sp apresentou redução acentuada na transcrição de AT1R. Em relação aos dados proteicos, observou-se intensa marcação de AT1R no grupo que recebeu A779 e Ang II antes da Sp. Dessa forma, sugerimos que, em um primeiro momento (anterior a 6 horas), o efeito combinado do A779, Ang II e Sp aumentou a expressão de RNAm de AT1R, o que se refletiu na elevada marcação fluorescente observada após 6 horas. Logo, no ponto temporal de 6 horas, a expressão de RNAm de AT1R se encontrava

reduzida nesse mesmo grupo (A779 + Ang II + Sp), refletindo um menor estímulo pró-transcricional para AT1R, possivelmente em decorrência de sua hiperativação pela combinação dos estímulos e do pré-tratamento. Efeitos semelhantes já foram descritos em outros modelos celulares, nos quais a Ang II foi capaz de reduzir a expressão de AT1R, em condições de hiperativação do receptor (Chen *et al.*, 2002; Zhang; Sun, 2006). Isto ocorre devido à ativação prolongada do AT1R, que pode induzir sua fosforilação e dessensibilização, reduzindo, em seguida, suas respostas (García-Caballero *et al.*, 2001). Assim, as respostas observadas no grupo A779 + Sp + Ang II podem representar um mecanismo de limitação da expressão de AT1R após sua ativação prolongada.

O AT1R também parece desempenhar um papel importante na produção de citocinas induzida pela Sp nos OTBs. A estimulação com Ang II aumentou a liberação de IL-1 β , enquanto o pré-tratamento com LOS reverteu essa resposta. O antagonismo de AT1R por LOS também reduziu os níveis de TNF- α e IL-8 induzidos pela Sp, bem como liberação de CCL-2 nos OTBs sensibilizados com Ang II. É amplamente reconhecido que a Ang II promove respostas pró-inflamatórias e pró-fibróticas por meio da ativação de AT1R (Kanugula *et al.*, 2023b). De fato, estudos anteriores demonstraram que a LOS pode reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias em culturas celulares, inclusive em modelos estimulados com Sp (Hermawan *et al.*, 2023; Sripratak *et al.*, 2024). Estudos prévios *in vitro* e *in silico* demonstraram que a molécula de LOS possui elevada afinidade de ligação à ECA2 e é capaz de reduzir a afinidade entre a Sp e a ECA2 ao se ligar diretamente à enzima (Kelaidonis *et al.*, 2023; Nejat; Sadr, 2020). Isso sugere que a LOS também pode atenuar a liberação de citocinas induzida pela Sp, independentemente de sua interação com o AT1R. Além disso, nos grupos em que a sensibilização com Ang II precedeu a exposição à Sp, os pré-tratamentos com LOS, DIZE e AVE reduziram a liberação de TNF- α , IL-1 β e CCL-2, bem como a expressão gênica de AT1R. Considerando que estudos anteriores demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , podem estimular a transcrição de AT1R por meio do NF- κ B (Cowling *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2002), propomos que a Ang II amplifica o aumento de AT1R induzido pela Sp nos OTBs, não apenas por intensificar a autorregulação positiva do receptor, mas também por favorecer a liberação de citocinas. Essas citocinas, por sua vez, estimulam ainda mais

a expressão de AT1R, estabelecendo um ciclo de retroalimentação positiva no qual o AT1R contribui continuamente para a produção de citocinas induzida pela Sp.

Em relação à ECA2, embora sua expressão tenha sido detectada nas células A549 e BSMC (mas não nas células MRC-5), os OTBs apresentaram níveis de RNAm de ECA2 superiores aos observados em cada tipo celular isoladamente. Sabe-se que células pulmonares apresentam baixa expressão de ECA2 (Gheware *et al.*, 2022); no entanto, já foi observado aumento da expressão dessa enzima em culturas celulares em interface ar-líquido e em organoides de células alveolares (Gandikota *et al.*, 2024; Sasaki *et al.*, 2021b). Além disso, é conhecido que a proteína Sp pode se ligar às células e desencadear respostas inflamatórias, independentemente da ECA2, inclusive em células que não expressam essa proteína ou a expressam em níveis mínimos, como as células MRC-5 (Anderson *et al.*, 2025; Cai *et al.*, 2023; Khan *et al.*, 2021).

Observamos baixa marcação fluorescente de ECA2 após a estimulação com Sp ou Ang II, inclusive nos grupos sensibilizados com Ang II antes da Sp, apesar do aumento da expressão gênica de ECA2 nessa última condição. Embora a redução da proteína ECA2 induzida por Ang II ou Sp esteja bem estabelecida na literatura (Deshotels *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2022; Xiao; Haack; Zucker, 2013), os efeitos da Sp sobre a transcrição de ECA2 permanecem inconsistentes. Em células pulmonares em cultura, a proteína Sp já foi associada tanto ao aumento (Lee *et al.*, 2022; Sui *et al.*, 2021) quanto à redução (Gao *et al.*, 2022) da expressão de RNAm de ECA2. Em nosso trabalho, demonstramos que, pelo menos inicialmente, a redução da proteína ECA2 ocorre independentemente de alterações em sua transcrição. Estudos anteriores mostraram que tanto a Sp quanto a Ang II podem, isoladamente, aumentar a expressão gênica de ECA2 (Caputo *et al.*, 2022; Robles *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2021). Considerando que, nos OTBs, a Sp foi capaz de induzir o aumento da transcrição de ECA2 apenas sob sensibilização com Ang II, sugerimos que a Ang II modula a resposta dos OTBs à estimulação com Sp acerca da expressão gênica de ECA2. Nós propomos que a perda precoce de proteína ECA2 induzida por Ang II e Sp desloca o equilíbrio SRA local em direção ao eixo pró-inflamatório, aumentando a produção endógena de Ang II e a liberação de citocinas. Em resposta, a sinalização autócrina das próprias citocinas e da Ang II pode desencadear uma regulação compensatória nos OTBs, resultando no aumento da transcrição de ECA2. Essa

hipótese é consistente com evidências de que citocinas como TNF- α e IL-1 β podem induzir o aumento da expressão gênica de ECA2 (Coperchini *et al.*, 2021; Fignani *et al.*, 2020). O pré-tratamento com AVE e LOS esteve associado à redução da produção de citocinas, incluindo TNF- α , IL-1 β e CCL-2, bem como a menores níveis de RNAm e de fluorescência de ECA2, indicando que, uma vez reduzida a liberação dessas citocinas, também diminui o estímulo à transcrição de ECA2. É importante destacar que o pré-tratamento com DIZE, um conhecido ativador de ECA2, também esteve associado à redução da liberação de TNF- α , CCL-2, IL-1 β e IL-8. O DIZE é reconhecido por exercer efeitos anti-inflamatórios no pulmão, por aumentar a atividade da ECA2 e por prevenir sua clivagem mediada pela ADAM-17 (Wang *et al.*, 2021). Além disso, o DIZE apresenta efeitos antivirais complementares que podem contribuir para a atenuação da liberação de citocinas induzida por Sp e por Ang II. Análises *in silico* e *in vitro* demonstraram que o DIZE pode interagir com a proteína Sp, inibindo a interação entre seu RBD e a ECA2, de forma dependente da concentração (Matsoukas *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2022).

Sabe-se que os efeitos vasoconstritores e inflamatórios mediados pelo AT1R podem ser contrabalançados pelo MASR. Ele é um receptor acoplado à proteína G codificado pelo proto-oncogene *MAS1*, que exerce ações vasodilatadoras e anti-inflamatórias por meio da inibição da via NF- κ B e da ativação da via ERK1/2 (Jiang *et al.*, 2019; Kuriakose; Montezano; Touyz, 2021). No contexto da COVID-19, relatou-se que os pacientes apresentam subativação do MASR e de seu eixo protetor (Rivas-Santisteban *et al.*, 2021). Considerando a resposta inflamatória desencadeada pela estimulação com Sp, e que essa mesma glicoproteína causou um aumento da expressão de MASR nos OTBs, nós supomos que essa elevação de expressão possa ser um mecanismo celular compensatório, como uma tentativa de reestabelecer o balanço homeostático pulmonar, por regular positivamente o eixo ECA2/Ang 1-7/MASR do SRA, o qual exerce funções protetoras no pulmão (Gopallawa; Uhal, 2016; Shen *et al.*, 2023; Thiruvengataramani *et al.*, 2020). O mecanismo responsável por mediar essa resposta compensatória pode envolver a coexpressão e a heterodimerização entre MASR e AT1R, discutidas anteriormente, em que o aumento da expressão de MASR acompanha o aumento da expressão de AT1R, induzida pela Sp. Os pré-tratamentos com AVE e DIZE promoveram a ativação do MASR, evidenciada pelo aumento da expressão de RNAm e de proteína desse receptor nos

grupos estimulados com Sp. De fato, a autorregulação positiva do MASR já foi descrita, na qual a Ang 1-7, produto enzimático da ECA2, é capaz de aumentar a expressão desse receptor (Huang *et al.*, 2019). Observou-se uma redução significativa na expressão de RNAm de MASR no grupo sensibilizado com Ang II, em comparação com o grupo que recebeu apenas Sp. Nenhum dos pré-tratamentos administrados, incluindo LOS, AVE e DIZE, foi capaz de modificar essa resposta. Entretanto, observou-se intensa marcação fluorescente da proteína MASR após o pré-tratamento com LOS. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a sinalização via AT1R, promovida pela Ang II e, indiretamente, pela Sp, pode impedir o aumento compensatório da expressão gênica de MASR em resposta à Sp, afetando negativamente a ativação do eixo anti-inflamatório do SRA.

O AVE reduziu a liberação de TNF- α , IL-1 β e CCL-2, mesmo na presença de sensibilização por Ang II. O papel anti-inflamatório do MASR em células pulmonares é bem documentado, como demonstrado pela redução da produção de CCL-2 em células epiteliais brônquicas estimuladas com LPS e tratadas com AVE (Hong *et al.*, 2021). De forma semelhante, a Ang 1-7 pode reduzir a expressão de IL-8 e IL-6 em células epiteliais brônquicas estimuladas pela subunidade S1 da Sp (Shen *et al.*, 2023), além de atenuar a liberação de TNF- α e IL-1 β em células endoteliais pulmonares estimuladas por LPS (Li *et al.*, 2015). Adicionalmente, observou-se aumento de TNF- α nos OTBs estimulados com Sp e previamente tratados com A779, indicando que a sinalização basal do MASR exerce um efeito inibitório sobre a expressão constitutiva de TNF- α .

Em conjunto, nossos resultados experimentais reforçam o papel do eixo ECA2/Ang 1-7/MASR na atenuação da liberação de citocinas induzida por Sp e Ang II, por meio da ativação farmacológica do MASR e da ECA2. Desde o início da pandemia, a modulação farmacológica do SRA pelos bloqueadores do receptor de angiotensina (BRAs) e pelos inibidores da ECA (iECAs) tem sido considerada uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da COVID-19 (Bavishi; Maddox; Messerli, 2020). Entretanto, os resultados de ensaios clínicos recentes que avaliam o uso de BRAs em pacientes com COVID-19 têm sido divergentes. Enquanto alguns estudos demonstram que BRAs e iECAs estão associados à redução da pneumonia induzida pelo SARS-CoV-2, outros apresentam resultados neutros ou inconclusivos (Camelo *et al.*, 2025; Felber *et al.*, 2024). Esses autores sugerem que tais

inconsistências podem decorrer de diferenças na farmacodinâmica dos moduladores do SRA, nos desenhos experimentais dos estudos ou na gravidade da doença apresentada pelos pacientes. Como alternativa, agonistas do MASR, como a 20-hidroxiecdisona, têm demonstrado potencial de benefício clínico em pacientes hospitalizados com COVID-19, sugerindo que a ativação do MASR pode representar uma abordagem terapêutica viável (Lobo *et al.*, 2024). Considerando que os dados clínicos atualmente disponíveis permanecem inconclusivos quanto à eficácia terapêutica dos moduladores do SRA na COVID-19, nossos resultados reforçam as possíveis vantagens da estimulação farmacológica do eixo ECA2/Ang 1-7/MASR na COVID-19. Ainda assim, estudos adicionais *in vivo* são necessários para confirmar essas respostas e determinar se a ativação de MASR e ECA2 pode efetivamente se traduzir em benefícios clínicos.

Em suma, demonstramos que os OTBs constituem um modelo de cultura tridimensional funcional para o estudo das interações entre a proteína Sp e o SRA. Além disso, mostramos que a sensibilização prévia com Ang II potencializa diversas respostas induzidas pela Sp, incluindo aumento da expressão de AT1R, alterações na expressão de ECA2 e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a ativação farmacológica do eixo ECA2/Ang 1-7/MASR, por meio do AVE e do DIZE, foi capaz de atenuar a liberação de citocinas e modular a expressão de componentes-chave do SRA. Esses achados reforçam a importância do equilíbrio entre os eixos SRA no pulmão e destacam o potencial terapêutico do restabelecimento desse equilíbrio na COVID-19.

6 CONCLUSÃO

Em suma, dentro dos limites do nosso estudo, demonstramos que a Ang II modula a resposta à proteína Sp em um modelo de organoide de bronquíolo, aumentando a expressão de AT1R, contribuindo para a liberação de citocinas, promovendo redução da expressão proteica de ECA2 e prevenindo o aumento compensatório da expressão gênica do MASR. Além disso, nosso estudo fornece novas informações sobre como os moduladores do SRAA, particularmente os ativadores de MASR e de ACE2, podem modificar a fisiopatologia da COVID-19.

REFERÊNCIAS

ABD, Ekram W. *et al.* SARS-CoV-2 Transmission Channels: A Review of the Literature. **MEDICC review**, v. 22 4, p. 51–69, 2020.

ABDUL-HAFEZ, Amal; SHU, Ruijie; UHAL, Bruce D. JunD and HIF-1 α mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF- β 1 in human lung fibroblasts. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1655–1662, jun. 2009.

ABOUDOUNYA, Mohamed M.; HEADS, Richard J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 8874339, 2021.

AL-ALY, Ziyad; ROSEN, Clifford J. Long Covid and Impaired Cognition — More Evidence and More Work to Do. **New England Journal of Medicine**, v. 390, n. 9, p. 858–860, 28 fev. 2024.

ALEEM, Abdul; AKBAR SAMAD, Abdul Bari; VAQAR, Sarosh. Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)(Archived). *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.

ALVIM, Renata G. F. *et al.* From a recombinant key antigen to an accurate, affordable serological test: Lessons learnt from COVID-19 for future pandemics. **Biochemical Engineering Journal**, v. 186, p. 108537, ago. 2022.

ANDERSON, Michael *et al.* Defining diverse spike-receptor interactions involved in SARS-CoV-2 entry: Mechanisms and therapeutic opportunities. **Virology**, v. 607, p. 110507, jun. 2025.

ANTONI, Delphine *et al.* Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 11 mar. 2015a.

ANTONI, Delphine *et al.* Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 11 mar. 2015b.

ASHOUR, Laith. Roles of the ACE/Ang II/AT1R pathway, cytokine release, and alteration of tight junctions in COVID-19 pathogenesis. **Tissue Barriers**, v. 11, n. 2, p. 2090792, 2022.

ATLAS, Steven A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. **Journal of Managed Care Pharmacy : JMCP**, v. 13, n. 8 Suppl B, p. 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9, out. 2007.

BANU, Nehla *et al.* Protective role of ACE2 and its downregulation in SARS-CoV-2 infection leading to Macrophage Activation Syndrome: Therapeutic implications. **Life Sciences**, v. 256, p. 117905, 1 set. 2020.

BAVISHI, Chirag; MADDOX, Thomas M.; MESSERLI, Franz H. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection and Renin Angiotensin System Blockers. **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 7, p. 745–747, 1 jul. 2020.

BERGER, Imre; SCHAFFITZEL, Christiane. The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity. **Cell Research**, v. 30, n. 12, p. 1059–1060, dez. 2020.

BOSTANGHADIRI, Narjess *et al.* COVID-19: An Overview of SARS-CoV-2 Variants—The Current Vaccines and Drug Development. **BioMed Research International**, v. 2023, p. 1879554, 29 ago. 2023.

BRAGA, Gabriela Catão D. *et al.* Restoring lung renin-angiotensin system balance through blood pressure control. **Clinical Science**, v. 139, n. 03, p. 215–227, 4 fev. 2025.

BRESLIN, Susan; O'DRISCOLL, Lorraine. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5, p. 240–249, 1 mar. 2013.

BREZNICEANU, M. L. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. **Kidney International**, v. 69, n. 11, p. 1977–1985, 1 jun. 2006.

BURGHI, Valeria *et al.* Participation of Gai-Adenylate Cyclase and ERK1/2 in Mas Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 22 fev. 2019.

CAI, Jiehao *et al.* The spike protein of SARS-CoV-2 induces inflammation and EMT of lung epithelial cells and fibroblasts through the upregulation of GADD45A. **Open Medicine**, v. 18, n. 1, p. 20230779, 15 nov. 2023.

CAMELO, Serge *et al.* Modulation of the renin-angiotensin system against COVID-19: A path forward? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 154, p. 107867, 1 maio 2025.

CAPUTO, Ilaria *et al.* Angiotensin II Promotes SARS-CoV-2 Infection via Upregulation of ACE2 in Human Bronchial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5125, 4 maio 2022.

CDC. **CDC Museum COVID-19 Timeline**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>>. Acesso em: 18 abr. 2026.

CDC. **Symptoms of COVID-19**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/covid/signs-symptoms/index.html>>. Acesso em: 14 jun. 2026.

CHEN, Xi *et al.* Angiotensin II and cAMP regulate AT1-mRNA expression in rat cardiomyocytes by transcriptional mechanism. **European Journal of Pharmacology**, v. 448, n. 1, p. 1–9, 12 jul. 2002.

COPERCHINI, Francesca *et al.* Modulation of ACE-2 mRNA by inflammatory cytokines in human thyroid cells: a pilot study. **Endocrine**, v. 74, n. 3, p. 638–645, 2021.

Coronavírus Brasil. , 8 set. 2025. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 18 abr. 2026

COSTA, Elisabete C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1427–1441, dez. 2016.

COWLING, Randy T. *et al.* Transcription Factor NF- κ B Is Necessary for Up-regulation of Type 1 Angiotensin II Receptor mRNA in Rat Cardiac Fibroblasts Treated with Tumor Necrosis Factor- α or Interleukin-1 β *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 8, p. 5719–5724, 22 fev. 2002.

CROWLEY, Steven D. *et al.* Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17985–17990, 21 nov. 2006.

CROWLEY, Steven D.; RUDEMILLER, Nathan P. Immunologic Effects of the Renin-Angiotensin System. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 5, 2017.

DEGUCHI, Sayaka *et al.* SARS-CoV-2 Research Using Human Pluripotent Stem Cells and Organoids. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1491–1499, 1 nov. 2021.

DESHOTELS, Matthew R. *et al.* Angiotensin-II mediates ACE2 Internalization and Degradation through an Angiotensin-II type I receptor-dependent mechanism. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 64, n. 6, p. 1368–1375, dez. 2014.

DONG, Mengzhen *et al.* ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110678, nov. 2020.

DUVAL, Kayla *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266–277, jul. 2017.

EGUCHI, Satoru *et al.* Understanding Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling in Vascular Pathophysiology. **Hypertension**, v. 71, n. 5, p. 804–810, maio 2018.

EL-HASHIM, Ahmed Z. *et al.* Angiotensin-(1–7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-κB-dependent pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 6, p. 1964–1976, jul. 2012.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **SARS-CoV-2 variants of concern as of 24 April 2026**. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>>. Acesso em: 28 abr. 2026.

FAN, Xiaoyi *et al.* Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3618, 17 jul. 2020.

FEIFAN HE *et al.* **Persistence of SARS-CoV-2 in Platelets and Megakaryocytes in Long COVID. CROI Conference**, 3 mar. 2024. Disponível em: <<https://www.croiconference.org/abstract/persistence-of-sars-cov-2-in-platelets-and-megakaryocytes-in-long-covid/>>. Acesso em: 14 jun. 2026

FELBER, Randy *et al.* SARS-CoV-2 and the Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor: Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor/Angiotensin 2 Receptor Blocker Utilization and a Shift Towards the Renin-Angiotensin-Aldosterone System Classical Pathway. **Cureus**, v. 16, n. 3, 5 mar. 2024.

FIGNANI, Daniela *et al.* SARS-CoV-2 Receptor Angiotensin I-Converting Enzyme Type 2 (ACE2) Is Expressed in Human Pancreatic β -Cells and in the Human Pancreas Microvasculature. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 13 nov. 2020.

FINSTERER, Josef *et al.* Extrapulmonary onset manifestations of COVID-19. **Clinics**, v. 76, p. e2900, 2021.

GAGLIARDI, Sophia *et al.* The Renin–Angiotensin System Modulates SARS-CoV-2 Entry via ACE2 Receptor. **Viruses**, v. 17, n. 7, p. 1014, jul. 2025.

GANDIKOTA, Chaitanya *et al.* The use of human iPSC-derived alveolar organoids to explore SARS-CoV-2 variant infections and host responses. **Journal of Medical Virology**, v. 96, n. 4, p. e29579, 2024.

GAO, Xiang *et al.* Spike-mediated ACE2 down-regulation was involved in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection. **Journal of Infection**, v. 85, n. 4, p. 418–427, 1 out. 2022.

GARCÍA-CABALLERO, A. *et al.* Angiotensin AT(1) receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Roles of protein kinase c and phosphoinositide 3-kinase. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 576–585, mar. 2001.

GENG, Yan-Lai *et al.* The role of angiotensin-(1-7) on acquired platinum resistance-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. **Neoplasma**, v. 68, n. 4, p. 770–779, jul. 2021.

GHEWARE, Atish *et al.* ACE2 protein expression in lung tissues of severe COVID-19 infection. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 4058, 8 mar. 2022.

GONG, Jingjing *et al.* ACE2 inhibits proliferation of smooth muscle cell through AT1R and its downstream signaling pathway. **Journal of Biosciences**, v. 48, n. 3, p. 25, 27 jul. 2023.

GONZALEZ, Alexis A. *et al.* Angiotensin II stimulates renin in inner medullary collecting duct cells via protein kinase C and independent of epithelial sodium channel and mineralocorticoid receptor activity. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 57, n. 3, p. 594–599, mar. 2011.

GOPALLAWA, Indiwari; UHAL, Bruce D. Angiotensin-(1–7)/mas inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells through upregulation of MAP kinase phosphatase-2. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, n. 3, p. L240–L248, fev. 2016.

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

GORSHKOV, Kirill *et al.* Quantum Dot-Conjugated SARS-CoV-2 Spike Pseudo-Virions Enable Tracking of Angiotensin Converting Enzyme 2 Binding and Endocytosis. **ACS Nano**, v. 14, n. 9, p. 12234–12247, 22 set. 2020.

GUPTA, Aakriti *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, jul. 2020.

GUPTA, Dipankar *et al.* Renin angiotensin aldosterone system in pulmonary fibrosis: Pathogenesis to therapeutic possibilities. **Pharmacological Research**, v. 174, p. 105924, 1 dez. 2021.

HAISLER, William L. *et al.* Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, out. 2013.

HAN, Yuling *et al.* Human organoid models to study SARS-CoV-2 infection. **Nature Methods**, v. 19, n. 4, p. 418–428, abr. 2022.

HENRY, Brandon M. *et al.* Coronavirus disease 2019 is associated with low circulating plasma levels of angiotensin 1 and angiotensin 1,7. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 678–680, 2021.

HERMAWAN, Hanestya Oky *et al.* Losartan Has a Comparable Effect to Human Recombinant ACE2 in Reducing Interleukin-6 (IL-6) Levels on Human Adipocytes Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein. **The Indonesian Biomedical Journal**, v. 15, n. 5, p. 311–7, 18 out. 2023.

HIRANO, Toshio; MURAKAMI, Masaaki. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. **Immunity**, v. 52, n. 5, p. 731–733, 19 maio 2020.

HONG, Luna *et al.* Mas receptor activation attenuates allergic airway inflammation via inhibiting JNK/CCL2-induced macrophage recruitment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111365, 1 maio 2021.

HOU, Yixuan J. *et al.* SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. **Cell**, v. 182, n. 2, p. 429- 446.e14, 23 jul. 2020.

HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

HUANG, Weifeng *et al.* Activating Mas receptor protects human pulmonary microvascular endothelial cells against LPS-induced apoptosis via the NF-kB p65/P53 feedback pathways. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 8, p. 12865–12875, ago. 2019.

HUSSMAN, John P. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 29 jul. 2020.

IDE, Noriko *et al.* Angiotensin II increases expression of IP-10 and the renin-angiotensin system in endothelial cells. **Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 31, n. 6, p. 1257–1267, jun. 2008.

IMAI, Yumiko *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 112–116, jul. 2005.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 33, 6 mar. 2020.

JIA, Hong Peng *et al.* Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, n. 1, p. L84–L96, jul. 2009.

JIANG, Mei *et al.* Anti-inflammatory effects of Ang-(1-7) via TLR4-mediated inhibition of the JNK/FoxO1 pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 92, p. 291–298, mar. 2019.

JUREWICZ, Mollie *et al.* Human T and Natural Killer Cells Possess a Functional Renin-Angiotensin System: Further Mechanisms of Angiotensin II–Induced Inflammation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 4, p. 1093, abr. 2007.

KANUGULA, Ashok Kumar *et al.* Renin-Angiotensin System: Updated Understanding and Role in Physiological and Pathophysiological States. **Cureus**, v. 15, n. 6, p. e40725, jun. 2023a.

KANUGULA, Ashok Kumar *et al.* Renin-Angiotensin System: Updated Understanding and Role in Physiological and Pathophysiological States. **Cureus**, v. 15, n. 6, p. e40725, jun. 2023b.

KAPALCZYŃSKA, Marta *et al.* 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 14, n. 4, p. 910–919, jun. 2018.

KASCHINA, Elena; NAMSOLLECK, Pawel; UNGER, Thomas. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. **Pharmacological Research**, Frontiers in the renin-angiotensin-aldosterone system Research. v. 125, p. 39–47, 1 nov. 2017.

KAUR, Jasleen; ROUT, Preeti. Physiology, Renin Angiotensin System. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2026.

KELAIDONIS, Konstantinos *et al.* Computational and Enzymatic Studies of Sartans in SARS-CoV-2 Spike RBD-ACE2 Binding: The Role of Tetrazole and Perspectives as Antihypertensive and COVID-19 Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8454, 8 maio 2023.

KHAN, Shahanshah *et al.* SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-κB pathway. **eLife**, v. 10, p. e68563, 6 dez. 2021.

KHAZAAL, Shaymaa *et al.* The Pathophysiology of Long COVID throughout the Renin-Angiotensin System. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2903, 2 maio 2022.

KILLINGLEY, Ben *et al.* Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. **Nature Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1031–1041, maio 2022.

KIM, Michael D. *et al.* Losartan reduces cigarette smoke-induced airway inflammation and mucus hypersecretion. **ERJ Open Research**, v. 7, n. 1, 25 jan. 2021.

KLEIN, Nadine *et al.* Angiotensin-(1–7) Protects From Experimental Acute Lung Injury. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 11, p. e334, nov. 2013.

KORANG, Steven Kwasi *et al.* Vaccines to prevent COVID-19: A living systematic review with Trial Sequential Analysis and network meta-analysis of randomized clinical trials. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0260733, 21 jan. 2022.

KOSTENIS, Evi *et al.* G-Protein–Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. **Circulation**, v. 111, n. 14, p. 1806–1813, 12 abr. 2005.

KOUHPAYEH, Hamid Reza *et al.* Association between angiotensinogen (AGT), angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin-II receptor 1 (AGTR1) polymorphisms and COVID-19 infection in the southeast of Iran: a preliminary case-control study. **Translational Medicine Communications**, v. 6, n. 1, p. 26, 2021.

KURIAKOSE, Jithin; MONTEZANO, Augusto C.; TOUYZ, Rhian M. ACE2/Ang-(1–7)/Mas1 axis and the vascular system: vasoprotection to COVID-19-associated vascular disease. **Clinical Science**, v. 135, n. 2, p. 387–407, 29 jan. 2021.

LAUER, Stephen A. *et al.* The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Annals of Internal Medicine**, p. M20- 0504, 10 mar. 2020.

LEE, Sangjae *et al.* SARS-CoV-2 Induces Expression of Cytokine and MUC5AC/5B in Human Nasal Epithelial Cell through ACE 2 Receptor. **BioMed Research International**, v. 2022, n. 1, p. 2743046, 2022.

LEMHÖFER, Christina *et al.* Aktualisierte S1-Leitlinie Long/Post-COVID: Relevante Aspekte für die Schmerzmedizin. **Schmerz (Berlin, Germany)**, p. 1–8, 16 mar. 2023.

LI, Shumin *et al.* ACE2 Attenuates Epithelial-Mesenchymal Transition in MLE-12 Cells Induced by Silica. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 1547–1559, 21 abr. 2020.

LI, Xiaopeng *et al.* Extravascular sources of lung angiotensin peptide synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 291, n. 5, p. L887–L895, nov. 2006.

LI, Yingchuan *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1–7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide–induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF–kB pathways. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8209, 3 fev. 2015.

LIU, Na *et al.* **High rate of increased level of plasma Angiotensin II and its gender difference in COVID-19: an analysis of 55 hospitalized patients with COVID-19 in a single hospital, WuHan, China.** medRxiv, , 1 maio 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.27.20080432v1>>. Acesso em: 14 jun. 2026

LOBO, Suzana Margareth *et al.* Efficacy of oral 20-hydroxyecdysone (BIO101), a MAS receptor activator, in adults with severe COVID-19 (COVA): a randomized, placebo-controlled, phase 2/3 trial. **eClinicalMedicine**, v. 68, p. 102383, 1 fev. 2024.

LU, Roujian *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

LU, Yi *et al.* SARS-CoV-2 down-regulates ACE2 through lysosomal degradation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 33, n. 14, p. ar147, dez. 2022.

LUBBE, Lizelle *et al.* ACE2 and ACE: structure-based insights into mechanism, regulation and receptor recognition by SARS-CoV. **Clinical Science (London, England : 1979)**, v. 134, n. 21, p. 2851–2871, nov. 2020.

MANGALMURTI, Nilam; HUNTER, Christopher A. Cytokine Storms: Understanding COVID-19. **Immunity**, v. 53, n. 1, p. 19–25, 14 jul. 2020.

MATSOUKAS, John M. *et al.* Diminazene Aceturate Reduces Angiotensin II Constriction and Interacts with the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1731, jul. 2022.

MILA SHAKYA, DPhil *et al.* Early Detection and Surveillance of the SARS-CoV-2 Variant BA.3.2 — Worldwide, November 2024–February 2026. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 75, 2026.

MIYATA, Kayoko *et al.* ROCK/NF- κ B axis-dependent augmentation of angiotensinogen by angiotensin II in primary-cultured preglomerular vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 306, n. 6, p. F608–F618, 15 mar. 2014.

NASCIMENTO, Luciano. **Alta de covid-19 faz cidade do Amazonas retomar uso de máscara**. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2025-04/alta-de-casos-de-covid-19-faz-cidade-do-am-retomar-uso-de-mascara>>. Acesso em: 14 jun. 2026.

NEHME, Ali *et al.* Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10035, 20 maio 2015.

NEJAT, Reza; SADR, Ahmad Shahir. Are losartan and imatinib effective against SARS-CoV2 pathogenesis? A pathophysiologic-based in silico study. **In Silico Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 1, 4 dez. 2020.

NEJAT, Reza; TORSHIZI, Maziar Fayaz; NAJAFI, David J. S Protein, ACE2 and Host Cell Proteases in SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity; Is Soluble ACE2 a Two Blade Sword? A Narrative Review. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 204, fev. 2023.

OLIVEIRA, Katelin X. *et al.* Naturally Occurring Angiotensin Peptides Enhance the SARS-CoV-2 Spike Protein Binding to Its Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 13, p. 6067, jan. 2025.

ÖRD, Mihkel; FAUSTOVA, Ilona; LOOG, Mart. The sequence at Spike S1/S2 site enables cleavage by furin and phospho-regulation in SARS-CoV2 but not in SARS-CoV1 or MERS-CoV. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16944, 9 out. 2020.

PAN, Hang *et al.* The ACE2-Ang-(1-7)-Mas Axis Modulates M1/M2 Macrophage Polarization to Relieve CLP-Induced Inflammation via TLR4-Mediated NF- κ B and

MAPK Pathways. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 2045–2060, 20 maio 2021.

PARK, Jung-Eun *et al.* Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 43, p. 12262–12267, 25 out. 2016.

PATRA, Tapas *et al.* SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009128, 7 dez. 2020.

PAUL, Martin; POYAN MEHR, Ali; KREUTZ, Reinhold. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, jul. 2006.

PELUSO, Michael J. *et al.* Plasma-based antigen persistence in the post-acute phase of COVID-19. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. e345–e347, jun. 2024a.

PELUSO, Michael J. *et al.* Tissue-based T cell activation and viral RNA persist for up to 2 years after SARS-CoV-2 infection. **Science Translational Medicine**, v. 16, n. 754, p. eadk3295, 3 jul. 2024b.

PENG, JianFeng *et al.* Tumor Necrosis Factor- α -Induced AT₁ Receptor Upregulation Enhances Angiotensin II-Mediated Cardiac Fibroblast Responses That Favor Fibrosis. **Circulation Research**, v. 91, n. 12, p. 1119–1126, 13 dez. 2002.

PRESTES, Thiago Ruiz Rodrigues *et al.* The Anti-Inflammatory Potential of ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis: Evidence from Basic and Clinical Research. **Current Drug Targets**, v. 18, n. 11, p. 1301–1313, 2017.

PROAL, Amy D. *et al.* Targeting the SARS-CoV-2 reservoir in long COVID. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. e294–e306, 1 maio 2025.

PUCCI, Fabrizio *et al.* Quantifying Renin-Angiotensin-System Alterations in COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2755, out. 2021.

RAHMATI, Masoud *et al.* Long-Term Sequelae of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of Symptoms 3 Years Post-SARS-CoV-2 Infection. **Journal of Medical Virology**, v. 97, n. 6, p. e70429, jun. 2025.

RAVI, Maddaly *et al.* 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015.

REDONDO, Natalia *et al.* SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 708264, 7 jul. 2021.

REIN, Johannes; BADER, Michael. Renin-Angiotensin System in Diabetes. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 9, p. 833–840, 1 set. 2017.

RIGONI, Marta *et al.* “Long COVID” results after hospitalization for SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9581, 10 jun. 2022.

RIVAS-SANTISTEBAN, Rafael *et al.* Novel Interactions Involving the Mas Receptor Show Potential of the Renin–Angiotensin system in the Regulation of Microglia Activation: Altered Expression in Parkinsonism and Dyskinesia. **Neurotherapeutics**, v. 18, n. 2, p. 998–1016, abr. 2021.

ROBERT KOCH-INSTITUT. Long COVID in adults – a current review of the long-term health effects following SARS-CoV-2 infection. 2026.

ROBLES, Juan Pablo *et al.* The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5\beta 1$ and NF- κ B signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 3, 1 mar. 2022.

ROCHA, Roseany Patricia Silva *et al.* Post-COVID-19 syndrome among hospitalized COVID-19 patients: a cohort study assessing patients 6 and 12 months after hospital discharge. **Cadernos De Saude Publica**, v. 40, n. 2, p. e00027423, 2024.

RUIZ-ORTEGA, Marta *et al.* Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor κ B Through AT1 and AT2 in Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research**, v. 86, n. 12, p. 1266–1272, 23 jun. 2000.

SANO, Emi *et al.* Cell response analysis in SARS-CoV-2 infected bronchial organoids. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 516, 30 maio 2022.

SANTOS, Esley S. *et al.* Antiviral potential of diminazene aceturate against SARS-CoV-2 proteases using computational and *in vitro* approaches. **Chemico-Biological Interactions**, v. 367, p. 110161, 1 nov. 2022.

SANTOS, Robson Augusto Souza *et al.* The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 316, n. 5, p. H958–H970, 1 maio 2019.

SASAKI, Michihito *et al.* SARS-CoV-2 variants with mutations at the S1/S2 cleavage site are generated in vitro during propagation in TMPRSS2-deficient cells. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. e1009233, 21 jan. 2021a.

SASAKI, Michihito *et al.* Air-liquid interphase culture confers SARS-CoV-2 susceptibility to A549 alveolar epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 577, p. 146–151, 5 nov. 2021b.

SCHLEIFENBAUM, Johanna. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 107, 11 jun. 2019.

SEIXAS, Maria Luiza *et al.* Disruptive 3D in vitro models for respiratory disease investigation: A state-of-the-art approach focused on SARS-CoV-2 infection. **Biomaterials and Biosystems**, v. 11, p. 100082, 16 jul. 2023.

SHAH, Priyanka *et al.* The Case for S2: The Potential Benefits of the S2 Subunit of the SARS-CoV-2 Spike Protein as an Immunogen in Fighting the COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 9 mar. 2021.

SHEN, Hui *et al.* MDM2-Mediated Ubiquitination of Angiotensin-Converting Enzyme 2 Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. **Circulation**, v. 142, n. 12, p. 1190–1204, 22 set. 2020.

SHEN, Yi-Luen *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**, v. 56, n. 6, p. 1147–1157, dez. 2023.

SONG, Peipei *et al.* Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 509, p. 280–287, out. 2020.

SORIANO, Joan B. *et al.* A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. e102–e107, abr. 2022.

SRIPRATAK, Khate *et al.* Losartan as a Reproposing Therapeutic Agent in Acute Respiratory Distress Syndrome: Modulating Inflammatory Responses and Cytokine Production. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 120–132, 2024.

SUI, Yongjun *et al.* SARS-CoV-2 Spike Protein Suppresses ACE2 and Type I Interferon Expression in Primary Cells From Macaque Lung Bronchoalveolar Lavage. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 4 jun. 2021.

SUN, Jiangming *et al.* ADAM-17 Activity and Its Relation to ACE2: Implications for Severe COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5911, 29 maio 2024.

TAWINWUNG, Supannikar; NINSONTIA, Chuanpit; CHANVORACHOTE, Pithi. Angiotensin II Increases Cancer Stem Cell-like Phenotype in Lung Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 35, n. 9, p. 4789–4797, 1 set. 2015.

TEPASSE, Phil-Robin *et al.* The Dysregulation of the Renin-Angiotensin System in COVID-19 Studied by Serum Proteomics: Angiotensinogen Increases with Disease Severity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 8, p. 2495, 12 abr. 2022.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Search TaqMan® Assays and Arrays**. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/?pearUXVerSuffix=pearUX2&elcanoForm=true#!/ge/assays/ge_all/?keyword=*&searchMethod=keyword&buildSearch=true>. Acesso em: 8 ago. 2026.

THIRUVENKATARAMANI, Ranga Prasanth *et al.* Mas Receptor Agonist AVE0991 increases surfactant protein expression under hyperoxic conditions in human lung epithelial cells. **Journal of lung, pulmonary & respiratory research**, v. 7, n. 4, p. 85–91, 2020.

UHAL, Bruce D. *et al.* Angiotensinogen gene transcription in pulmonary fibrosis. **International Journal of Peptides**, v. 2012, p. 875910, 2012.

VARGAS VARGAS, Rafael Antonio; VARELA MILLÁN, Jesús María; FAJARDO BONILLA, Esperanza. Renin–angiotensin system: Basic and clinical aspects—A general perspective. **Endocrinología, Diabetes Y Nutrición**, v. 69, n. 1, p. 52–62, jan. 2022.

WANG, Li-Fang *et al.* Diminazen Acetate Protects Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibition of ADAM17-Mediated Angiotensin-Converting Enzyme 2 Shedding. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 713632, 12 out. 2021.

WANG, Mei-Yue *et al.* SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 25 nov. 2020.

WHO COVID-19 dashboard. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>>. Acesso em: 18 abr. 2026.

WOROBEY, Michael. Dissecting the early COVID-19 cases in Wuhan. **Science**, v. 374, n. 6572, p. 1202–1204, 3 dez. 2021.

XIA, Xuhua. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 109, jan. 2021.

XIAO, Liang; HAACK, Karla K. V.; ZUCKER, Irving H. Angiotensin II regulates ACE and ACE2 in neurons through p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 304, n. 11, p. C1073–C1079, 1 jun. 2013.

XIE, Mingxuan; CHEN, Qiong. Insight into 2019 novel coronavirus — An updated interim review and lessons from SARS-CoV and MERS-CoV. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 119–124, 1 maio 2020.

YAN, Renhong *et al.* Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science (New York, N.y.)**, v. 367, n. 6485, p. 1444–1448, 27 mar. 2020.

YE, Rensong; LIU, Zhenwei. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 113, p. 104350, 1 abr. 2020.

YUE, Xiaoyang *et al.* Induced antibodies directed to the angiotensin receptor type 1 provoke skin and lung inflammation, dermal fibrosis and act species overarching. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 81, n. 9, p. 1281–1289, set. 2022.

ZHANG, Hong; SUN, Geng-Yun. Expression and Regulation of AT1 Receptor in Rat Lung Microvascular Endothelial Cell. **Journal of Surgical Research**, v. 134, n. 2, p. 190–197, 1 ago. 2006.

ZHANG, Kai *et al.* Angiotensin(1–7) attenuates the progression of streptozotocin-induced diabetic renal injury better than angiotensin receptor blockade. **Kidney International**, v. 87, n. 2, p. 359–369, 1 fev. 2015.

ZHOU, Ye *et al.* SARS-CoV-2 Spike protein enhances ACE2 expression via facilitating Interferon effects in bronchial epithelium. **Immunology Letters**, v. 237, p. 33–41, 1 set. 2021.

ZHU, Na *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.