

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Jonathan Lopes Moreira

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MAS E MRGD NO
EPITÉLIO NASAL DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE E EUTRÓFICOS
INFECTADOS PELO SARS-COV-2 NO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA.**

Diamantina
2023

Jonathan Lopes Moreira

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MAS E MRGD NO
EPITÉLIO NASAL DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE E EUTRÓFICOS
INFECTADOS PELO SARS-COV-2 NO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Campos Villela
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira

**Diamantina
2023**

Catálogo na fonte - Sisbi/UFVJM

L864a Lopes Moreira, Jonathan
2024 Avaliação da Expressão Gênica de Receptores MAS e MRGD no Epitélio Nasal de Indivíduos com Obesidade e Eutróficos Infectados pelo SARS-CoV-2 no Município de Diamantina. [manuscrito] / Jonathan Lopes Moreira. -- Diamantina, 2024. 66 p. : il.

Orientador: Prof. Daniel Campos Villela.

Coorientador: Prof. Danilo Bretas de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Diamantina, 2023.

1. Sistema Renina-Angiotensina. 2. Receptores de Angiotensina. 3. Obesidade. 4. COVID-19. 5. SARS-CoV-2. I. Villela, Daniel Campos . II. Oliveira, Danilo Bretas de . III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFVJM com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Este produto é resultado do trabalho conjunto entre o bibliotecário Rodrigo Martins Cruz/CRB6-2886 e a equipe do setor Portal/Diretoria de Comunicação Social da UFVJM

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES MAS E MRGD
NO EPITÉLIO NASAL DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE E EUTRÓFICOS
INFECTADOS PELO SARS-COV-2 NO MUNICÍPIO DE DIAMANTINA.**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE, nível de MESTRADO como
parte dos requisitos para obtenção do
título de MESTRE EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

Orientador (a): Prof. Dr. Daniel
Campos Villela

Data da aprovação : 15/12/2023



Documento assinado digitalmente
DANIEL CAMPOS VILLELA
Data: 06/02/2024 16:47:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr. DANIEL CAMPOS VILLELA - UFVJM



Documento assinado digitalmente
CRISTIANE ROCHA FAGUNDES MOURA
Data: 06/02/2024 10:42:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.Dr.^a CRISTIANE ROCHA FAGUNDES MOURA - UFVJM



Documento assinado digitalmente
ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS
Data: 02/02/2024 10:36:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS - UFVJM

*Aos meus pais que dormiram em filas, à noite, para
matricular eu e meus irmãos em uma boa escola.
À presença constante de Deus e Nossa Senhora.
Meu muito obrigado!*

AGRADECIMENTOS

Fazer mestrado era um sonho! E como qualquer sonho em minha vida, eu não sabia como poderia torná-lo realidade. Contudo, graças a muita fé e a pessoas maravilhosas consegui realizar essa utopia.

E essa realização não é só minha, mas de todos aqueles que me ofereceram auxílio, companhia e suporte quando eu precisei:

Agradeço ao meu pai, Altivo da Conceição Moreira, e a minha mãe, Claríssima de Fátima Lopes Moreira, por sempre dedicarem tempo, esforços, carinho, conselhos, amor e por instigar em mim a vontade mais genuína de ser uma pessoa honesta e esforçada, que conquista os objetivos por meio da educação!

Aos meus irmãos Lázaro e Bárbara por serem exemplos para mim quando me sinto perdido a tanta demanda do cotidiano. Agradeço aos meus cunhados por serem base para meus irmãos.

Às minhas sobrinhas, por serem ilhas de descanso quando as vejo. Por me darem a sensação de que tudo vai ser bom, vai dar certo e com muita alegria.

Em especial às minhas tias Maria, Ana e Deodora, por serem mulheres fortes, corretas e me fortalecerem no aconchego de suas personalidades.

À família Lopes e Moreira, que são representações de alegria e força pra mim.

Ao Johnny, que me escutava e me dava apoio quando me sentia sem forças.

Ao meu orientador Daniel Campos Villela, que quando é necessário me explica e até desenha para que eu possa entender. Obrigado pela calma e compreensão.

Ao meu coorientador Danilo Bretas pelos conhecimentos passados.

À professora Etel Rocha Vieira pelo suporte, conhecimento, orientação e parceria nesses anos de mestrado.

Aos amigos cientistas do BioEx, LADIP e NUPED-Vale pela felicidade de compartilhar dias com vocês.

Aos amigos Maysa Farias e Thyago José pelo suporte, amizade e conversas. Ao Marco Antônio Schetino por tudo isso e por estar sempre preocupado comigo e com esta pesquisa.

Às amigas Tamires e Alice, por serem exemplos de humanos e cientistas. O mestrado se tornou leve ao lado de vocês. Obrigado por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos amigos que acumulei nesta vida, entre eles GM, Finds, Curvelo, obrigado por compartilhar momentos incríveis ao longo dessa vida. Sobretudo ao grupo de amigos do Café, que são outras ilhas para descanso quando me sinto esgotado.

À banca examinadora, por compartilhar seus conhecimentos e sabedorias.

Ao Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq) pela disponibilidade de estrutura, equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro para que eu pudesse me dedicar à pesquisa.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Essa instituição se tornou a peça fundamental na minha vida! Obrigado pela excelência.

*Eu sei dos números que eu represento e quero que
outros(as) olhem para mim e vejam que é possível.
(Adaptado de Sonia Guimarães)*

RESUMO

A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento da COVID-19, pois gera um estado inflamatório local e sistêmico que pode afetar a função de outros tecidos. Esse cenário corrobora para uma resposta agudizada em infecção por SARS-CoV-2. A obesidade também está associada à desregulação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) que também sugere risco elevado de maior gravidade por COVID-19. Ademais, a desregulação do SRA pode ser promovida pela própria interação do SARS-CoV-2 com a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2). Os receptores MAS e MRGD, podem favorecer efeitos resolutivos contrários à inflamação durante uma infecção. Torna-se imprescindível reconhecer a expressão tecidual desses receptores e suas possíveis alterações diante a desafios patológicos. Trata-se de um estudo observacional, analítico de caso-controle que avaliou a expressão dos genes dos receptores MAS e MRGD em adultos infectados pelo SARS-CoV-2 por meio da técnica de RT-qPCR em amostras nasofaríngeas. Os indivíduos foram agrupados com: 18 pessoas com obesidade e positivas para COVID-19 (OB+), 17 pessoas com obesidade e negativas para COVID-19 (OB-), 9 eutróficos e positivos para COVID-19 (EU+) e 9 eutróficos e negativos para COVID-19 (EU-). Dessa amostra 71,70 % (n = 38) eram do sexo feminino e a idade dos participantes variou entre 32 anos a 42 anos. A manifestação clínica com maior incidência foi a tosse, entre os OB+ 15 (83,33 %) e a anosmia entre os EU+ 7 (77,78 %). Hipertensão arterial sistêmica foi a comorbidade mais relatada entre os OB+ 6 (33,33 %). O grupo dos OB- e EU- expressaram mais genes do receptor MAS do que o grupo dos OB+ (p < 0,0001), também houve diferença significativa entre os grupos EU+ e EU- (p < 0,0001) para esse receptor, sendo o grupo dos EU- demonstrando maior expressão. Em relação ao MRGD, houve diferença de expressão quando se compara EU+ em relação aos EU- (p = 0,0003), sendo maior expressão para aqueles negativos para COVID-19 e o grupo EU- expressou mais MRGD em relação aos OB- (p = 0,0003) e OB+ (p < 0,0001). Em análise separada, observa-se diferença significativa entre OB+ e OB- (p < 0,0001). Acreditamos que este estudo inova ao demonstrar a presença da expressão dos genes dos receptores MAS e MRGD no trato respiratório de seres humanos e a comparar tais expressões à composição corporal e à COVID-19. Assim, demonstramos que tanto a obesidade quanto a infecção por SARS-CoV-2 podem diminuir a expressão desses receptores.

Palavras chave: Sistema Renina-Angiotensina; Receptores de Angiotensina; Obesidade; COVID-19; Doença por coronavírus 2019; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Obesity is a risk factor for the development of COVID-19, as it generates a local and systemic inflammatory state that can affect the function of other tissues. This scenario corroborates an acute response in SARS-CoV-2 infection. Obesity is also associated with dysregulation of the Renin-Angiotensin System (RAS), which also suggests an increased risk of greater severity due to COVID-19. In addition, RAS dysregulation may be promoted by the interaction of SARS-CoV-2 with Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2). The MAS and MRGD receptors may favor resolving effects contrary to inflammation during an infection. It is essential to recognize the tissue expression of these receptors and their possible alterations in the face of pathological challenges. This is an observational, analytical case-control study that evaluated the expression of MAS and MRGD receptor genes in adults infected with SARS-CoV-2 using the RT-qPCR technique in nasopharyngeal samples. The individuals were grouped as follows: 18 people with obesity and positive for COVID-19 (OB+), 17 people with obesity and negative for COVID-19 (OB-), 9 eutrophic and positive for COVID-19 (EU+) and 9 eutrophic and negative for COVID-19 (EU-). Of this sample, 71.70% (n = 38) were female and the age of the participants ranged from 32 years to 42 years. The clinical manifestation with the highest incidence was cough, among the OB+ 15 (83.33 %) and anosmia among the EU+ 7 (77.78 %). Systemic arterial hypertension was the most reported comorbidity among the OB+ 6 (33.33 %). The OB- and EU- groups expressed more MAS receptor genes than the OB+ group ($p < 0.0001$), and there was also a significant difference between the EU+ and EU- groups ($p < 0.0001$) for this receptor, with the EU group showing greater expression. With regard to MRGD, there was a difference in expression when comparing EU+ to EU- ($p = 0.0003$), with greater expression for those negative for COVID-19 and the EU- group expressing more MRGD compared to OB- ($p = 0.0003$) and OB+ ($p < 0.0001$). In a separate analysis, there was a significant difference between OB+ and OB- ($p < 0.0001$). We believe that this study breaks new ground by demonstrating the presence of MAS and MRGD receptor gene expression in the respiratory tract of humans and comparing these expressions to body composition and COVID-19. Thus, we demonstrate that both obesity and SARS-CoV-2 infection can decrease the expression of these receptors.

Keywords: Renin-Angiotensin System; Angiotensin Receptors; Obesity; COVID-19; Coronavirus disease 2019; SARS-CoV-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura molecular do SARS-CoV-2 e interação com célula alvo.....	15
Figura 2 – Via clássica e alternativa do SRA.....	21
Figura 3 – Processo inflamatório pulmonar na COVID-19.....	26
Figura 4 – Centro colaborador em atividade e região de abrangência pactuada.....	31
Figura 5 – Montagem da placa.....	35
Figura 6 – Amplificação de curva em equipamentos do sistema StepOne™.....	37
Figura 7 – Fluxograma dos indivíduos participantes do estudo.....	38
Figura 8 – Expressão do gene MAS na mucosa nasofaríngea de indivíduos com e sem COVID-19 de acordo com IMC.....	44
Figura 9 – Expressão do gene MRGD na mucosa nasofaríngea de indivíduos com e sem COVID-19 de acordo com IMC.....	45
Figura 10 – Expressão do gene MRGD na mucosa nasofaríngea de indivíduos com obesidade em relação à infecção pelo SARS-CoV-2.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhamento dos primers utilizados para as reações de qPCR.....	32
Tabela 2 – Reagentes e volumes usados na reação de cDNA Kit Bio - Rad.....	33
Tabela 3 – Protocolo de reação para síntese de cDNA Kit Bio - Rad.....	33
Tabela 4 – Reagentes e volumes usados na reação de cDNA Kit Cellco.....	34
Tabela 5 – Protocolo de reação para síntese de cDNA Kit Cellco.....	34
Tabela 6 – Reagentes e volumes usados para reação de RT - qPCR.....	35
Tabela 7 – Caracterização quanto ao IMC, sexo e idade dos participantes do estudo.....	39
Tabela 8 – Manifestações clínicas predominantes.....	40
Tabela 9 – Comorbidades prévias predominantes.....	41
Tabela 10 – Medicções contínuas em uso prévio ao estudo relacionadas aos participantes..	41
Tabela 11 – Grau de COVID-19 e tempo de internação.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
AT1	Receptores para Angiotensina I
β -Act.	Beta-Actina
BioEx	Laboratório de Biologia do Exercício e Imunometabolismo
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CIPq (Saúde)	Centro Integrado de Pesquisa e Pós-graduação
CoV	Coronavírus
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina II
EU+	Eutróficos positivos para COVID-19
EU-	Eutróficos negativos para COVID-19
Forw.	Forward (Senso)
GPCRs	Receptores Acoplados à Proteína G
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
HCoVs	Coronavírus que infectam humanos
IFN	Interferon
IL	Interleucinas
ISGs	Genes Estimulados por IFN
LADIP	Laboratório de Doenças Infecto-Parasitárias
LEAC	Laboratório-Escola de Análises Clínicas
MAS	Receptor MAS
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MRGD	Receptor acoplado à proteína G Relacionado ao Mas - Tipo D
M1	Macrófagos Inflamatórios
M2	Macrófagos Antiinflamatórios
OB+:	Pessoas com obesidade positivas para COVID-19
OB-:	Pessoas com obesidade negativas para COVID-19

OMS	Organização Mundial de Saúde
ORFs	Quadros de Leitura Aberta
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
Rev.	Reverse (Antisenso)
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcrição Reversa
S	Glicoproteínas de Superfície Espícula, ou Spike
S1	Subunidade de Ligação ao Receptor
S2	Subunidade de Fusão de Membranas
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TAB	Tecido adiposo branco
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	Células T reguladoras
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 SARS-CoV-2.....	14
2.2 COVID-19.....	16
2.3 Obesidade.....	18
2.3.1 <i>Obesidade e COVID-19</i>	19
2.4 Sistema Renina-Angiotensina e o eixo ECA2 / Angiotensina-(1-7) / receptores MAS-MRGD.....	20
2.4.1 <i>MAS</i>	22
2.4.2 <i>MRGD</i>	23
2.4.3 <i>O SRA e a obesidade</i>	24
2.4.4 <i>O SRA e a COVID-19</i>	24
2.4.5 <i>Receptores MAS, MRGD e a COVID-19</i>	26
3. JUSTIFICATIVA.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo Geral.....	28
4.2 Objetivos Específicos.....	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 Aspectos Éticos.....	29
5.2 Delineamento Experimental.....	29
5.2.1 <i>Critérios de Inclusão</i>	30
5.2.2 <i>Critérios de Exclusão</i>	30
5.3 Coleta de Dados.....	30
5.4 Diagnóstico da COVID-19.....	31
5.5 Extração de RNA.....	31
5.6 Escolha de Primers.....	32
5.7 Síntese de cDNA.....	33
5.8 Quantificação da expressão de MAS e MRGD.....	34
5.8.1 <i>Reação de RT - qPCR</i>	34
5.8.2 <i>Análise da RT - qPCR</i>	36
5.9 Análise Estatística.....	37
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Delimitação da população.....	37
6.2 Características dos participantes.....	38
6.2.1 <i>Manifestações clínicas</i>	39
6.2.2 <i>Comorbidades prévias</i>	40
6.2.3 <i>Medicações em uso</i>	41
6.3 Grau de severidade da COVID-19 e internação.....	42

6.4 Expressão de MAS.....	43
6.5 Expressão de MRGD.....	44
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO A.....	65

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, dada a efetiva transmissão zoonótica dos coronavírus (CoV), foram disseminadas diversas doenças em âmbito global (WIERSINGA *et al.*, 2020) como, por exemplo, a síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2002 pelo SARS-CoV (ZHU *et al.*, 2019; WIERSINGA *et al.*, 2020) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 pelo MERS-CoV (ZHU *et al.*, 2019; WIERSINGA *et al.*, 2020). Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou estado de pandemia a Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), evidenciada pelo surgimento e disseminação vertiginosa do agente etiológico SARS-CoV-2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Foram demonstrados altos índices de mortalidade pela COVID-19 em várias regiões do mundo (ZHANG *et al.*, 2023) e alguns fatores de risco podem estar relacionados a esse aumento. Entre eles destacam-se a idade superior a 65 anos, sexo masculino, presença de doenças pré-existentes (cardiovasculares, pulmonares, renais e metabólicas), bem como possíveis complicações desenvolvidas durante a infecção por COVID-19 (PEREIRA *et al.*, 2022; TAZERJI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2023; YEC *et al.*, 2022). Contudo, as mortes referidas nos estudos epidemiológicos representam somente uma parcela da contagem real de mortalidade (MSEMBURI *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2022). A confiabilidade das estimativas variou consideravelmente entre os países devido a vários motivos, como os sistemas de notificação de assistência médica empregados, sua qualidade e abrangência; a falta de um acordo universal sobre quando diagnosticar uma morte devido a COVID-19; e por fim, alguns ideais políticos podem ter impedido o registro fidedigno de mortes (MSEMBURI *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2022).

Sabe-se que há também significativa relação entre comorbidades e o desenvolvimento de manifestações clínicas graves ou exacerbadas da COVID-19 (DIETZ *et al.*, 2020; SIMONNET *et al.*, 2020; RAMALINGAM *et al.*, 2017). A obesidade, por exemplo, é um fator de risco relevante para desenvolvimento e agravamento da COVID-19 (RITTER *et al.*, 2020), contudo ainda não está claro na literatura sobre o mecanismo fisiopatológico dessa relação. Algumas interações indiretas, sugerem que o tecido adiposo em excesso favorece a hiperatividade do sistema complemento e produção de citocinas, contribuindo para a caracterização de uma patogênese pró-inflamatória chamada tempestade de citocinas (RAMALINGAM *et al.*, 2017; RITTER *et al.*, 2020).

Outro fator crítico pode ser a desregulação do Sistema Renina Angiotensina (SRA) que é um sistema enzimático e hormonal participante no ajuste da homeostase de múltiplos sistemas, sobretudo o cardiovascular e imunológico (COSTA *et al.*, 2020; EL-ARIF *et al.*,

2021; KHAZAAL *et al.*, 2022). Sugere-se que, na infecção por SARS-CoV-2, o SRA esteja superativado devido à ligação do vírus à ECA2 e, por consequência, a clivagem das angiotensinas em produtos pertinentes à efeitos anti-inflamatórios seria dificultada, além de favorecer o eixo pró-inflamatório, o que contribui também para a síndrome da tempestade de citocinas. (COSTA *et al.*, 2020; EL-ARIF *et al.*, 2021; KHAZAAL *et al.*, 2022).

Dada a importância da relação entre COVID-19, obesidade e o sistema SRA e inflamatório, torna-se necessária a investigação e esclarecimento da patogênese da COVID-19, sobretudo para identificar a suscetibilidade de alguns pacientes do grupo de risco. A desregulação ou desequilíbrio de fatores pró e anti-inflamatórios poderiam desencadear uma patogênese mais exacerbada em pacientes com obesidade em relação aos eutróficos (TAZERJI *et al.*, 2022; KHAZAAL *et al.*, 2022).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

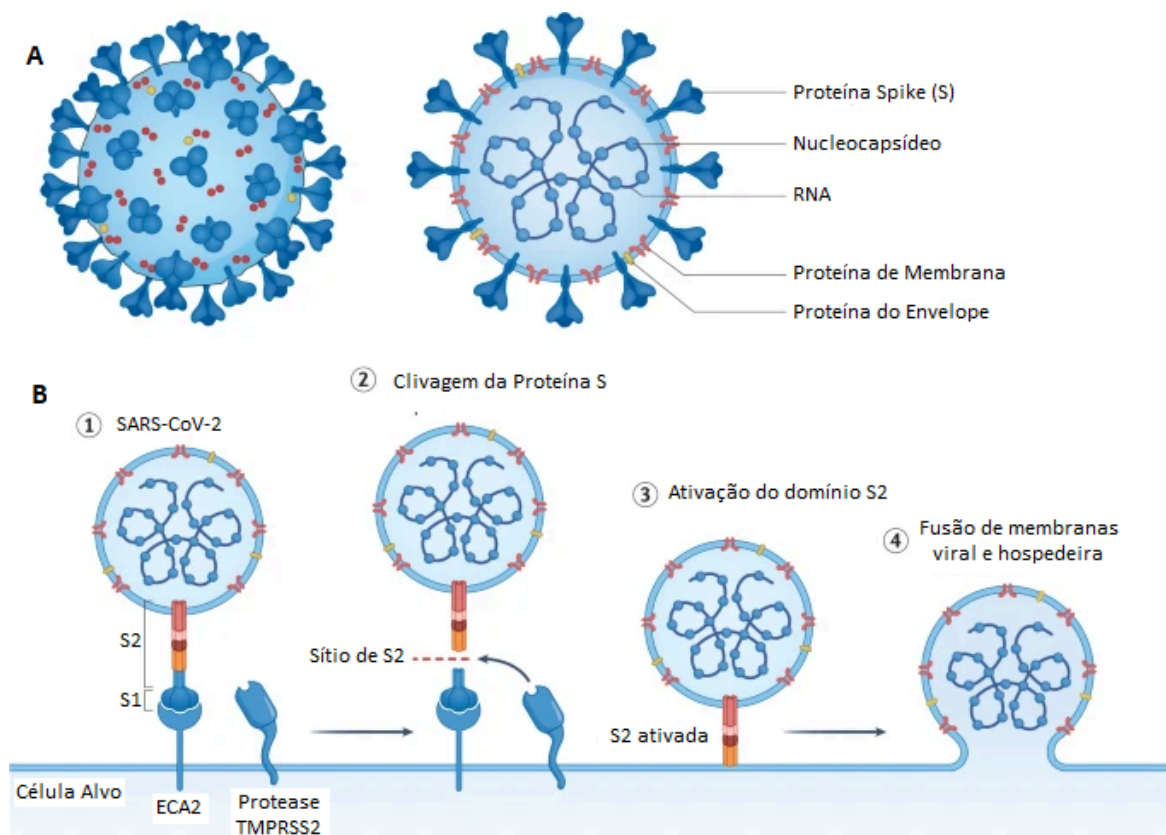
2.1 SARS-CoV-2

Até o momento, são conhecidos sete variáveis de coronavírus (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-Cov-2) com a capacidade de infectar seres humanos (HCoVs) (WU *et al.*, 2020). De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses, o SARS-CoV-2 pertence ao reino *Riboviria*, da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, cujo gênero é o *betacoronavírus* (KIM *et al.*, 2020; GORBALENYA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). Trata-se de um retrovírus com ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva, envelopado, com bicamada lipídica proveniente da célula infectada e constituído de proteínas estruturais, não estruturais e acessórias (LAMERS; HAAGMANS, 2022).

A propensão do SARS-CoV-2 em infectar uma célula hospedeira humana é mediada pela proteína S que é constituída de duas subunidades, sendo elas a subunidade de ligação ao receptor (S1) e a subunidade de fusão de membranas (S2) (LAMERS; HAAGMANS, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2020). A S1 se liga à ECA2 e, posteriormente, a subunidade S2 é clivada pela Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2) (LAMERS; HAAGMANS, 2022; HOFFMANN *et al.*, 2020). Dessa forma, a S2 é ativada e interpõem a fusão da bicamada lipídica viral à membrana da célula hospedeira acarretando a liberação do material genético do vírus no citoplasma da célula-alvo (LAMERS; HAAGMANS, 2022) (FIG. 1).

No interior celular, o RNA viral se liga aos ribossomos e inicia de modo direto a transcrição e replicação viral pela produção de 26 proteínas não estruturais por meio de dois quadros de leitura aberta (ORFs), ORF1a e ORF1b (LAMERS; HAAGMANS, 2022; KIM *et al.*, 2020). A partir do genoma viral total há a produção do RNA genômico que será disposto conjuntamente com as proteínas estruturais, acessórias e parte das membranas do retículo endoplasmático formando novos vírions (LAMERS; HAAGMANS, 2022; KIM *et al.*, 2020). Em seguida, os vírions são liberados na superfície celular por exocitose.

Figura 1 – Estrutura molecular do SARS-CoV-2 e interação com célula alvo.



(A) Representação da partícula viral de SARS-CoV-2: glicoproteína de superfície espícula, ou spike (S). (B) Interação entre a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e a proteína S na célula alvo pela subunidade de ligação ao receptor (S1) (1ª etapa). A serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) cliva a proteína S (2ª etapa). Ativação da subunidade de fusão de membranas (S2) (3ª etapa). Fusão das bicamadas lipídicas viral e da célula alvo com posterior deposição de genoma viral no compartimento intracelular (4ª etapa). Fonte: Adaptado de “Coronavirus Replication Cycle”, de BioRender.com (2023). Obtido em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

Após a infecção viral, as células hospedeiras podem reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e assim desencadear uma possível resposta imune inata (BEYER; FOREROMIN, 2021; MIN *et al.*, 2021). Tal resposta é caracterizada pela indução de genes que produzirão componentes do sistema interferon (IFN), sendo mais proeminentes

os IFN do tipo I (IFN- α e IFN- β), IFN do tipo III (IFN- λ) e alguns genes estimulados por IFN (ISG) (LAMERS; HAAGMANS, 2022; MELO *et al.*, 2021). Os IFN participam, sobretudo em barreiras epiteliais, restringindo a replicação e disseminação viral e também auxiliam no desenvolvimento da imunidade adaptativa subsequente facilitando assim a eliminação do vírus (MIN *et al.*, 2021).

Contudo, o SARS-CoV-2 possui alguns processos de evasão desses mecanismos (BEYER; FOREROMIN, 2021; MELO *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2 pode dificultar sua detecção reduzindo ou ocultando PAMPs, interferir na montagem de proteínas no hospedeiro, incluindo IFN, e, por fim, suprimir a ação dos IFN (MELO *et al.*, 2021; MIN *et al.*, 2021). Em vista disso, durante a infecção por SARS-CoV-2, a atividade de IFN pode ser pouco eficiente, o que pode agravar os processos patológicos do SARS-CoV-2.

Sabe-se ainda que de forma natural o SARS-CoV-2 sofre mutações no decorrer da replicação e grande parte dessas mutações não implicam em aumento da virulência (COSAR *et al.*, 2022). Contudo, algumas modificações genéticas levam à seleção de vírus modificados que podem escapar da ação imunológica e da proteção vacinal contemporânea, o que sugere aumentar a gravidade da infecção (COSAR *et al.*, 2022). Observa-se que essa recombinação genética colabora para possíveis evoluções virais ratificadas em diferentes regiões pela heterogeneidade dos sinais e sintomas atribuídos à COVID-19, o que sugere a presença de novas cepas (COSAR *et al.*, 2022).

2.2 COVID-19

Apesar de não haver consenso sobre o período de incubação, o tempo da exposição ao SARS-CoV-2 até o início dos sintomas pode durar em média de cinco a oito dias (LAMERS; HAAGMANS, 2022; WEI *et al.*, 2022; WIERSINGA *et al.*, 2020). Por expressarem altos níveis de ECA2 e TMPRSS2, é sugerido que células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior sejam a principal porta de entrada desse vírus, que se replica e migra até atingir células epiteliais alveolares (BORCZUK; YANTISS, 2022; GARCÍA *et al.*, 2022; LAMERS; HAAGMANS, 2022). Se há diminuição da ativação da imunidade inata ou desregulação da imunidade antiviral na mucosa do trato respiratório superior pode ocorrer o desenvolvimento da COVID-19 devido a dificuldade em eliminar o SARS-CoV-2 (LAMERS; HAAGMANS, 2022).

Outros tecidos também expressam quantidades variáveis de ECA2 e TMPRSS2. Dessa forma, o SARS-CoV-2 pode infectar células neurais, renais, endoteliais, do trato

intestinal, cardiomiócitos, entre outras (BORCZUK; YANTISS, 2022; WIERSINGA *et al.*, 2020). Os tecidos suscetíveis à infecção definem as diversas manifestações clínicas que podem ser expressas na COVID-19 (BORCZUK; YANTISS, 2022; LAMERS; HAAGMANS, 2022).

De acordo com a resposta imunológica individual, uma pessoa pode apresentar-se assintomática ou ter manifestações clínicas leves, moderadas ou graves (HU *et al.*, 2020). A maior parte da população apresentou sintomatologia leve a moderada, mais comumente tosse seca, febre, fadiga, distúrbios olfativos e gustativos (LAMERS; HAAGMANS, 2022; HU *et al.*, 2020). Já a COVID-19 grave está associada ao maior risco de desenvolvimento da SARS e insuficiência respiratória devido à síndrome da tempestade de citocinas (HU *et al.*, 2020).

Para detecção e diagnóstico do SARS-CoV-2, o padrão-ouro empregado é a reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa (RT-qPCR) (HU *et al.*, 2020; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2023). No entanto, a COVID-19 também pode ser diagnosticada por outros meios, como radiografia, tomografia computadorizada, testes sorológicos, semiologia clínica e até inteligência artificial (CHADAGA *et al.*, 2022; HU *et al.*, 2020; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2023).

Apesar dos esforços, ainda não existem terapias atuais que sejam eficazes e comprovadas contra o SARS-CoV-2 (HU *et al.*, 2020). Alguns estudos se apóiam em premissas fisiopatológicas da doença correlacionadas com o reparo tecidual e a inibição de componentes ligados à ação pró-inflamatória para possíveis tratamentos da COVID-19 (BRUSCOLI *et al.*, 2022; COUTO *et al.*, 2023; SHIRZAD *et al.*, 2022; YOO *et al.*, 2022). A vacinação continua sendo o método eficaz para prevenção e controle de surtos (COUTO *et al.*, 2023; HU *et al.*, 2020). Durante a realização deste estudo, 199 vacinas estão em etapa de estudos pré-clínicos e 183 vacinas estão na fase de ensaios clínicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Vários mecanismos são utilizados para a produção de vacinas, entre as tecnologias desenvolvidas estão: vírus inativados (CoronaVac, WIBP-CorV, BBIBP-CorV, BBV152); vetor viral não replicante, (ChAdOx1, Ad26.COV2.S, Gam-COVID-Vac); subunidade de proteína (NVX-CoV2373, FINLAY-FR-2); à base de ácidos nucleicos (BNT162b2, mRNA-1273, CVnCoV) entre outras (GRAÑA *et al.*, 2022; KUMARI *et al.*, 2022). Dessa forma, sabe-se que o uso de vacinas é a forma mais eficaz e pode diminuir a incidência da COVID-19 tanto para casos leves quanto para casos graves (GRAÑA *et al.*, 2022).

2.3 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica descrita por um estado energético desequilibrado que ocasiona hiperplasia e hipertrofia demasiada do tecido adiposo, sendo que esse excesso de gordura corporal pode determinar prejuízos à saúde (DE LEEUW *et al.*, 2021; GAMMONE; D'ORAZIO, 2021; RITTER *et al.*, 2020; RONDINI; GRANNEMAN, 2020; KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o número de indivíduos com obesidade acima de 20 anos duplicou de 2003 a 2019 (IBGE, 2020). Neste contexto, indivíduos adultos com excesso de peso representam mais de 60 % da população brasileira (IBGE, 2020).

O tecido adiposo branco (TAB) possui funções metabólicas, endócrinas e imunológicas que contribuem para a homeostase do balanço energético, da reparação tecidual e da resposta inflamatória (DE LEEUW *et al.*, 2021; RITTER *et al.*, 2020). Quando saudável, o parênquima deste tecido é composto por adipócitos, células estromais e várias células imunes como macrófagos residentes, células natural killer, mastócitos, monócitos, linfócitos T e B, neutrófilos e eosinófilos (RITTER *et al.*, 2020). O excesso de energia proveniente da alimentação pode ser armazenado no TAB, o qual se encontra distribuído corporalmente em depósitos de gordura subcutânea chamados de hipoderme (80%) e na gordura visceral (20%) (DE LEEUW *et al.*, 2021; RONDINI; GRANNEMAN, 2020; KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018). Por ser bastante adaptável, o TAB pode sofrer grande remodelação de acordo com demandas nutricionais, metabólicas e farmacológicas (RONDINI; GRANNEMAN, 2020). Devido ao aumento da ingesta energética, o tecido adiposo pode se expandir respectivo ao acúmulo de gordura visceral em detrimento à expansão da hipoderme e esse fato se relaciona fortemente à síndrome metabólica e à inflamação (DE LEEUW *et al.*, 2021; RONDINI; GRANNEMAN, 2020).

Dessa forma, a alimentação prolongada com exposição crônica ao excesso de energia e inatividade física podem levar à obesidade não saudável (KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018). Nesse sentido, os adipócitos hipertrofiados e hiperplásicos causam remodelação tecidual e promovem disfuncionalidade da matriz extracelular conjuntamente com angiogênese deficitária (RITTER *et al.*, 2020; KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018).

Há relações entre pluralidades de distúrbios e a obesidade devido às dissincronias entre as demandas e funções metabólicas, endócrinas e imunológicas (DE LEEUW *et al.*, 2021; GAMMONE; D'ORAZIO, 2021; RITTER *et al.*, 2020; RONDINI; GRANNEMAN,

2020; KUMARI; HEEREN; SCHEJA, 2018). Este fenômeno gera um estado inflamatório local, sistêmico, persistente e de desregulação que pode afetar desfavoravelmente a função de outros tecidos (DE LEEUW *et al.*, 2021; RITTER *et al.*, 2020; RONDINI; GRANNEMAN, 2020; TAMARA; TAHAPARY, 2020).

2.3.1 Obesidade e COVID-19

A obesidade é um fator de risco para hospitalização e para mortalidade relacionadas à COVID-19 (DE LEEUW *et al.*, 2021; GAMMONE; D'ORAZIO, 2021; TAMARA; TAHAPARY, 2020; VASHEGHANI *et al.*, 2022; RITTER *et al.*, 2020; SAWADOGO *et al.*, 2022).

A expansão não saudável do TAB pode ser acompanhada por uma vascularização insuficiente e esse mecanismo gera hipóxia e, por conseguinte, apoptose ou necrose de adipócitos e secreção aumentada de substâncias de característica inflamatória, como leptina, citocinas e quimiocinas (RITTER *et al.*, 2020). Essas substâncias são atraentes para células imunes inatas e adaptativas que infiltram o TAB e modificam o microambiente local para um estado inflamatório de baixo grau constante (RITTER *et al.*, 2020; VASHEGHANI *et al.*, 2022).

Quando a obesidade é mantida, há modificação na população celular ocorrendo diminuição de linfócitos T helper tipo 2 (Th2), macrófagos anti-inflamatórios (M2) e células T reguladoras (Treg), e aumento de macrófagos inflamatórios (M1), células T, células B, neutrófilos e mastócitos (DE LEEUW *et al.*, 2021; RITTER *et al.*, 2020). Consequentemente, ocorre produção de altas quantidades de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) caracterizando uma resposta imune anormal e desregulada com desequilíbrio entre fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (DE LEEUW *et al.*, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022; RITTER *et al.*, 2020).

A IL-6, IL-1 e TNF mantém o padrão inflamatório persistente prejudicando a resposta imune global (DE LEEUW *et al.*, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022). O aumento dessas citocinas e da produção de leptina geram maior expressão de moléculas de adesão com posterior estresse oxidativo e disfunção vascular (RITTER *et al.*, 2020). Emprega-se então um quadro de piora da hipóxia ao TAB devido à disfunção de células endoteliais e reduzida angiogênese. Assim, esse cenário corrobora para uma resposta inflamatória sustentada e

cíclica que pode ser agudizada em infecção por SARS-CoV-2 (DE LEEUW *et al.*, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022; RITTER *et al.*, 2020).

Sabe-se também que a ampliação do TAB é fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica e doenças cardiovasculares que, conjuntamente, podem aumentar a gravidade e mortalidade da COVID-19 em pessoas com obesidade (TAMARA; TAHAPARY, 2020; VASHEGHANI *et al.*, 2022). Sendo assim, o metabolismo lipídico desregulado, a resistência à insulina e o diabetes podem causar alterações sistêmicas como disfunção endotelial e proliferação do músculo liso, sobretudo nas vias aéreas (VASHEGHANI *et al.*, 2022). Tais processos podem ser amplificados pela infecção por SARS-CoV-2 (VASHEGHANI *et al.*, 2022).

A obesidade compromete de sobremaneira a função pulmonar (DE LEEUW *et al.*, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022). Significativo acúmulo de tecido adiposo abdominal e na parede torácica diminui a excursão diafragmática e reduz a complacência pulmonar, respectivamente (VASHEGHANI *et al.*, 2022). Devido à fraqueza muscular, o padrão respiratório também fica comprometido em pessoas com obesidade, a frequência respiratória aumenta e a respiração torna-se superficial. Portanto, há incongruência da relação ventilação e perfusão, sobretudo nas bases dos pulmões, o que diminui a saturação de oxigênio no sangue (DE LEEUW *et al.*, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022).

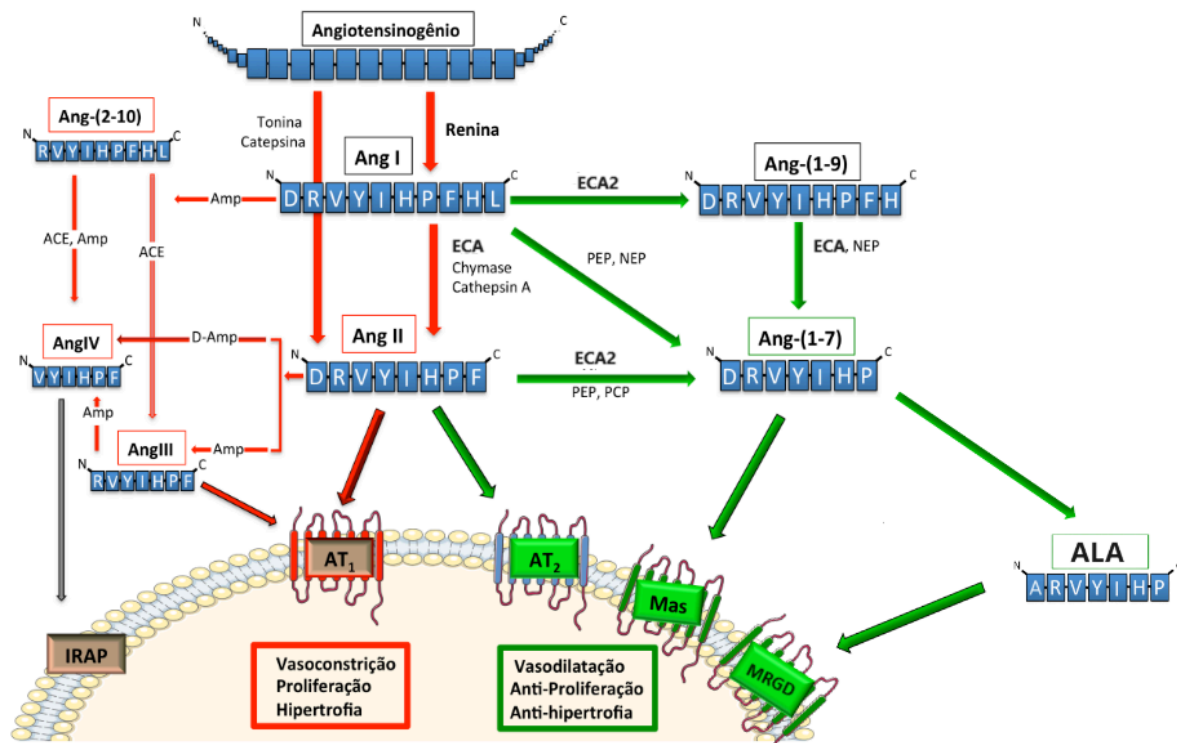
Ao utilizar a ECA2 para se ligar à membrana celular do hospedeiro, o SARS-CoV-2 internaliza-se juntamente com essa proteína resultando em uma diminuição funcional da ECA2 e ocasiona menor síntese dos peptídeos angiotensina-1-7 que terá sua ação antiinflamatória comprometida (GAMMONE; D'ORAZIO, 2021). Em outro ponto de vista, a desregulação do metabolismo de ácidos graxos promove a inflamação crônica que, por sua vez, pode lesar o endotélio vascular. A disfunção endotelial pode estimular o SRA pela ativação de receptores da enzima conversora de angiotensina (ECA) produzindo trombose e mais inflamação (GAMMONE; D'ORAZIO, 2021; VASHEGHANI *et al.*, 2022).

2.4 Sistema Renina-Angiotensina e o eixo ECA2 / Angiotensina-(1-7) / receptores MAS-MRGD

O Sistema Renina Angiotensina configura-se como um sistema endócrino, mas também com funções parácrinas e autócrinas (ROCHA, 2020). Desempenha um papel de interação entre as vias sistêmicas e locais, bem como as interações com o ambiente externo, o que configura na homeostase de fluidos (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021;

ROCHA, 2020). A dinâmica da via clássica do SRA é iniciada pela clivagem do angiotensinogênio para angiotensina I (Ang I) pela protease renina, em seguida o Ang I é convertida em angiotensina II (Ang II) pela ECA (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021). Com o avanço das investigações, novos componentes do SRA foram descobertos, por exemplo, a ECA2 que converte diretamente Ang II em Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021). A ECA2 pode converter ainda a Ang I em angiotensina-(1-9), sendo esta clivada em Ang-(1-7) pela ECA (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021) (FIG. 2).

Figura 2 - Via clássica e alternativa do SRA.



Em vermelho o eixo inflamatório e em verde o anti-inflamatório. Alamandina (ALA); aminopeptidase (Amp); angiotensinas (Ang); dipeptidil-aminopeptidase (D-Amp); enzima conversora da angiotensina (ECA); enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2); receptor MAS (MAS); receptor acoplado à proteína G Relacionado ao Mas - Tipo D (MRGD); neprilissina (NEP); prolilcarboxipeptidase (PCP); prolilendopeptidase (PEP); receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1); receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2); insulim regulado aminopeptidase (IRAP).
Fonte: Adaptado de VILLELA; PASSOS; SANTOS, 2014

O equilíbrio do SRA depende da dinâmica correta de suas vias para alcançar resultados de homeostase (SKORECKI, 2021; HIKMET *et al.*, 2020). Quando os estímulos tendem para a atuação da ECA, aumenta-se a produção de Ang II e a ativação de seus respectivos receptores para angiotensina I (AT1) estimulando ações como proliferação celular, inflamação, fibrose e trombose, o que pode ser prejudicial (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021; SPARKS *et al.*, 2020). Por outro lado, quando os estímulos tendem para a

atuação da ECA2, ocorre aumento da produção de Ang-(1-7), bem como a ativação de seus respectivos receptores MAS (MAS) e receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas - Tipo D (MRGD), estimulando ações de efeitos anti-inflamatórios, antifibróticos e antitrombóticos o que sugere contrabalancear os efeitos causados pela Ang II (ARMALY; KINANEH; SKORECKI, 2021; SPARKS *et al.*, 2020).

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode resultar em desequilíbrio homeostático nos componentes do SRA, promovida por mediadores de inflamação sistêmica e pró-coagulantes, presumivelmente associados às complicações fatais (VINCI *et al.*, 2021).

2.4.1 MAS

O MAS é um receptor da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) que corresponde ao grande grupo de proteínas localizadas na superfície das células e que participam de inúmeras ações quando associadas aos seus ligantes extracelulares, sendo eles fosfolipídios, hormônios, nucleotídeos purínicos, neurotransmissores, entre outros (ZOHN *et al.*, 1988). Estudos iniciais *in vivo* detectaram o receptor MAS como um proto-oncogenes devido às suas características tumorigênicas, as quais atualmente são consideradas irrisórias. Atualmente o MAS é considerado o receptor funcional para Ang-(1-7) (SANTOS *et al.*, 2003).

Possuem estrutura terciária de arranjo contendo sete domínios transmembranares, onde o receptor se encontra na porção extracelular e a proteína G na porção citoplasmática (ZOHN *et al.*, 1988). Quando o receptor é estimulado pelo seu ligante, ocorre uma mudança conformacional na estrutura da proteína que ativa a subunidade α da proteína G, a qual estará ligada à guanosina trifosfato (GTP) (ZOHN *et al.*, 1988). Então, a subunidade α se dissocia tanto do seu dímero $\beta\gamma$ quanto da estrutura proteica. Dessa forma, as subunidades α e $\beta\gamma$ ativam ou inibem moléculas citoplasmáticas sinalizadoras que produziram a ação estimulada pelo ligante ao receptor.

Em condições homeostáticas, a Ang (1-7) ativa o receptor MAS que pode gerar algumas sinalizações intracelulares, como gerar ácido aracdônico a partir da fosfolipase A; a via fosfoinosítídeo 3 pode ativar a proteína quinase B que em seguida fosforila a serina para ativar o óxido nítrico-sintase endotelial; por fim a ligação da Ang (1-7) ao receptor, também pode ativar o fator de transcrição do tipo 1 em forquilha pela desfosforilação na serina (BADER *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2003). Essa ligação promove efeitos fisiológicos como

ações anti-inflamatórias, antioxidantes, vaso relaxante e antitrombóticas, entre outros (SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2013; VINCI *et al.*, 2021).

O receptor MAS é expresso em vários tecidos e sistemas, como no cardiovascular, nervoso, em todas as estruturas renais, nos tecidos pulmonar e adiposo (FERREIRA *et al.*, 2010; POVLSEN *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2003). Observa-se que a expressão desses receptores pode gerar consequências fisiopatológicas significativas de proteção nesses órgãos e tecidos. (POVLSEN *et al.*, 2020).

2.4.2 MRGD

O MRGD é um membro D das GPCR, relacionado ao receptor MAS. Corresponde a um grupo de moléculas também sinalizadoras, de estrutura semelhante às proteínas G e que exercem papel em vários sistemas sensoriais, em mucosas e no sistema imunológico (RICO; KIM; SABOOR, 2021; SCHLEIFENBAUM, 2019).

É sabido que os receptores MRGD são expressos em alguns neurônios sensoriais, na retina e no sistema cardiovascular (SUZUKI *et al.*, 2022), mas também podem ser expressos em outros tecidos e órgãos, como no coração, artérias, músculo esquelético, traqueia, pulmão e tecido adiposo (ETELVINO; PELUSO; SANTOS, 2014). Em relação à regulação da excitabilidade neuronal, tem como ligante o ácido 5-oxoeicosatetraenóico que induz dor visceral e somática sem inflamação e o ligante a β -alanina que sinaliza estímulos de coceira, dor, além de estar relacionada à liberação de citocinas inflamatórias (ARORA *et al.*, 2021; SUZUKI *et al.*, 2022).

A ativação do MRGD por estes ligantes causam efeitos intracelulares pouco conhecidos (MILASTA *et al.*, 2005). Foi sugerido a interação com canais de potássio dependentes de voltagem e aumento de cálcio iônico intracelular, o qual estimula a fosforilação de proteínas quinases (CROZIER *et al.*, 2007; MILASTA *et al.*, 2005).

A alamandina foi reconhecida por sua potente interação com o receptor MRGD e assim ativar a sinalização intracelular correlacionada à proteína G, aumentando as concentrações de adenosina monofosfato cíclico e de óxido nítrico sintase endotelial (VILLELA; PASSOS; SANTOS, 2014). Esses efeitos demonstram antagonismo à Ang II, o qual está ligado ao eixo não clássico do SRA sugerindo uma ação protetora ao sistema cardiovascular e regulação da pressão arterial (VILLELA; PASSOS; SANTOS, 2014; SCHLEIFENBAUM, 2019; SUZUKI *et al.*, 2022). Ao se ligar ao MRGD, a ALA ainda atua diminuindo níveis de fator transformador de crescimento β (TGF- β), de caspase 3 e da

expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de causar aumento intracelular de superóxido dismutase e glutathione peroxidase que são enzimas antioxidantes. Tais efeitos podem mitigar a tempestade de citocinas relacionada à infecção por SARS-CoV-2 (SOLTANI; JAVANMARDI *et al.*, 2021).

2.4.3 O SRA e a obesidade

Classicamente, o SRA era discernido apenas de maneira circulante com funções endócrinas envolvendo o organismo como um todo. No entanto, atualmente sabe-se que alguns componentes deste sistema são produzidos localmente em tecidos específicos, como o tecido adiposo, demonstrando assim efeitos autócrinos e parácrinos (TING; DUTTON; SORISKY, 2023; KANUGULA *et al.*, 2023). O desequilíbrio de componentes do SRA tecidual pode ser significativo para o desenvolvimento de certas doenças, incluindo a obesidade (KANUGULA *et al.*, 2023).

A obesidade pode ser associada à elevada ativação do eixo clássico do SRA no TAB. Pessoas com obesidade expressam mais angiotensinogênio, sendo essa proteína mais observada no tecido adiposo visceral (KANUGULA *et al.*, 2023). Potencialmente, ocorre acréscimo dos níveis circulantes e locais da Ang II que, ao ativar o receptor AT1, proporciona alguns efeitos, dentre eles o pró-inflamatório e aumento do estresse oxidativo (TING; DUTTON; SORISKY, 2023; KANUGULA *et al.*, 2023).

A ECA2 é altamente expressa no tecido adiposo, e sua expressão está diretamente relacionada ao aumento do tecido adiposo (TING; DUTTON; SORISKY, 2023). É sabido que o SARS-CoV-2 utiliza a ECA2 como receptor para infectar células humanas (SUDHAKAR *et al.*, 2022). Esse fato pode diminuir os níveis de ECA2, o que sugere um distúrbio homeostático do eixo protetor ECA2 / Angiotensina-(1-7) / receptores MAS-MRGD e ocasiona maior risco de respostas adversas no desenvolvimento da COVID-19 devido a diminuição da atividade deste eixo. (TING; DUTTON; SORISKY, 2023; SUDHAKAR *et al.*, 2022).

2.4.4 O SRA e a COVID-19

A ECA2 é expressa de forma abrangente em vários tipos celulares de tecidos e órgãos humanos, como no sistema digestório, rins, cérebro, coração, vasos sanguíneos e nos

pulmões, o que hipoteticamente esclarece os sinais e sintomas da COVID-19 observados em diversos sistemas (SARZANI *et al.*, 2020).

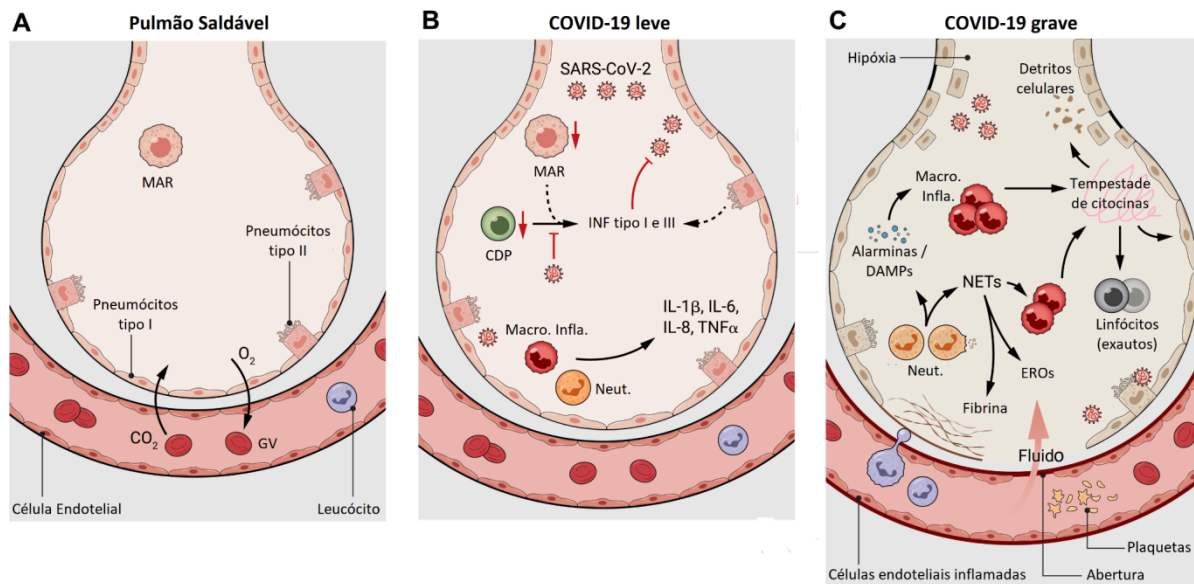
Em todo trato respiratório a ECA2 é expressa na superfície da membrana de células secretoras e epiteliais contribuindo para a homeostase corporal (SARZANI *et al.*, 2020). Contudo, o desequilíbrio de componentes entre os eixos do SRA clássico em detrimento do eixo contra-regulatório, viável devido à ECA2, pode colaborar para uma maior lesão pulmonar por efeitos inflamatórios (AKSOY; KARADAG; WOLLINA *et al.*, 2020; SARZANI *et al.*, 2020).

Há uma relação entre os fenótipos clínicos da COVID-19 e a inflamação causada pela resposta imune do hospedeiro (VANDERBEKE *et al.*, 2021). Na inflamação moderada à grave, o SARS-CoV-2 ao chegar nos alvéolos pulmonares pode ser detectado por macrófagos residentes e pneumócitos, os quais não produzem quantidades necessárias de IFN tipo I e III para a ativação antiviral parácrina (PALUDAN; MOGENSEN, 2022). Nessa situação, o vírus continua sua proliferação no sistema respiratório sem resposta eficaz do sistema imunológico, o que gera certo grau de inflamação.

Quando o eixo clássico do SRA está inadequadamente ativado ou quando há diminuição de ECA2, observa-se dano microvascular com adição da permeabilidade vascular proporcionando maior entrada de plasma, proteínas e células inflamatórias nos alvéolos pulmonares (SARZANI *et al.*, 2020). No seguimento fisiopatológico, observa-se esgotamento de células apresentadoras de antígenos e aumento da lesão tecidual aguda (PALUDAN; MOGENSEN, 2022). Macrófagos e neutrófilos infiltrados são cada vez mais ativados e expressam citocinas de maneira aberrante, promovendo mais influxo de leucócitos inflamatórios e agravamento do quadro, conhecido como chuva de citocinas (PALUDAN; MOGENSEN, 2022; VANDERBEKE *et al.*, 2021) (FIG 3).

O aumento de Ang II estimulando o receptor AT1 pode levar à estimulação de fibroblastos pulmonares ocasionando fibrose pulmonar ampla que finalmente ocasiona a síndrome do desconforto respiratório agudo observada na COVID-19 grave (AKSOY; KARADAG; WOLLINA *et al.*, 2020; SARZANI *et al.*, 2020). Dessa maneira, observa-se que a desregulação das vias locais do SRA tem potenciais atribuições no desenvolvimento da COVID-19 (AKSOY; KARADAG; WOLLINA *et al.*, 2020; SARZANI *et al.*, 2020).

Figura 3 - Processo inflamatório pulmonar na COVID-19.



(A) Representação de alvéolo saudável com lâmina respiratória preservada e troca gasosa funcional: dióxido de carbono (CO₂); glóbulo vermelho (GV); macrófagos alveolares residentes (MAR); Oxigênio (O₂). (B) Infecção por SARS-CoV-2 promove resposta imunológica e inflamatória: células dendríticas plasmocitóides (CDP); interleucina (IL); interferon (INF); macrófago inflamatório (Macro. Infla.); neutrófilo (Neut.); espécies reativas de oxigênio (EROs); fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). (C) Resposta inflamatória exacerbada: padrão molecular associado ao dano (DAMPs); armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Fonte: Adaptado de PALUDAN; MOGENSEN, 2022.

2.4.5 Receptores MAS, MRGD e a COVID-19

Os componentes do eixo não clássico do RAS, como os receptores MAS e MRGD, contribuem para restabelecer a homeostase sistêmica e tecidual frente à inflamação. É sugerido que a ativação dos receptores abrande doenças inflamatórias, contrariamente quando ocorre deficiência destes é observado ampliação de infiltrado leucocitário em processos patológicos (CARVALHO *et al.*, 2019).

Macrófagos e neutrófilos possuem os receptores MAS e MRGD, no momento em que são estimulados pelos seus ligantes, Ang-(1-7) e alamandina, diminuem o número dessas células, reduzem seus perfis inflamatórios e regulam negativamente a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (BARROSO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019). Em termos de COVID-19, caracteristicamente de patogênese inflamatória, a atuação desses receptores se mostra importante e necessária.

Circunstâncias orgânicas exacerbadas demandam do eixo ECA2 / Angiotensina-(1-7) / receptores MAS-MRGD um papel protetor. Como citado anteriormente, esses receptores são observados em vários tecidos e órgãos, em condições clínicas críticas, a ativação do MAS e MRGD podem induzir a melhora do status hemodinâmico, da disfunção endotelial e função renal, além de reduzir o tônus simpático, a pressão arterial e a fibrose pulmonar (BITKER;

BURRELL, 2019; GARCIA *et al.*, 2023; SARZANI *et al.*, 2020; (SOLTANI; JAVANMARDI *et al.*, 2021; KURIAKOSE; MONTEZANO; TOUYZ, 2021).

Considerando que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode gerar condições de agravamento em paciente com ou sem comorbidades, como cardiomiopatia, desconforto respiratório agudo e até choque, a ativação dos receptores MAS e MRGD é imperioso ao se confirmar suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e antifibróticas (SOLTANI; JAVANMARDI *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICATIVA

Em uma visão ampla, o SRA opera em todo o organismo humano ao considerar o equilíbrio eletrolítico corporal e regulação da pressão arterial (NEHME *et al.*, 2019). Já em determinados tecidos ou órgãos, exibe ações diferentes, independentes ou contribuintes de sua ação sistêmica e essa variedade fisiológica torna complexa a investigação clínica e até experimental, dos componentes do SRA locais que, por vez, podem não ser séricos atuando por mecanismos autócrinos e parácrinos (FRIGOLET; TORRES; TOVAR, 2013; PUCCI *et al.*, 2021).

O tecido adiposo exerce ações sistêmicas e locais quando se leva em conta o ajustamento energético e a regulação da imunidade e da inflamação. O SRA do tecido adiposo pode contribuir com ações fundamentais no metabolismo da glicose, de lipídios e também na inflamação, pois favorece uma boa resposta do organismo diante de infecções virais (TING; DUTTON; SORISKY, 2023). A obesidade está associada ao estresse pró-inflamatório, oxidativo e desregulação do SRA, o que sugere risco elevado de maior gravidade da COVID-19 (TING; DUTTON; SORISKY, 2023).

Ademais, a desregulação do SRA pode ser promovida pela própria interação do SARS-CoV-2 com a ECA2 nas células hospedeiras ocasionando desbalanço sistêmico e local de alguns componentes, como da própria ECA2, Ang II e Ang 1-7 (CARPENTER *et al.* 2022). É sugerido que a internalização do SARS-CoV-2 reduz o número de ECA2 na membrana plasmática das células do parênquima pulmonar, inicialmente ampliando o eixo Ang II/AT1 e, em seguida, alterando a homeostase dos componentes do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS diminuindo assim a eficiência de seu desempenho protetor e, conseqüentemente, propiciando lesão pulmonar aguda (MORGANSTEIN *et al.*, 2021; PUCCI *et al.*, 2021). Conseguir detectar tais elementos desbalanceados pode ser a chave para

compreender a diversidade das respostas fisiológicas à infecção e heterogeneidade de apresentações clínicas em pacientes com COVID-19.

Durante a ocorrência da pandemia de COVID-19 e em eventuais surtos de doenças emergentes, se reconhece a importância de utilizar novos e confiáveis marcadores biológicos para a classificação rápida de pacientes de grupo de risco e identificar a progressão da doença (FILES *et al.*, 2021; PONTI *et al.*, 2020). Apesar da hipótese de desequilíbrio do SRA tendendo para atividade pró-inflamatória relativa ao aumento de angiotensina II, contrariamente ao sentido anti inflamatório do Ang (1-7) e ALA, há diversos obstáculos para medir esses componentes (FILES *et al.*, 2021).

A disponibilidade tecidual e a ativação dos receptores MAS e MRGD podem favorecer efeitos resolutivos contrários à inflamação, fibrose, oxidação e trombose durante uma infecção (MAGALHÃES *et al.*, 2020). Assim sendo, torna-se imprescindível reconhecer a expressão tecidual de tais componentes do SRA e suas possíveis alterações diante a desafios patológicos (MAGALHÃES *et al.*, 2020; NEHME *et al.*, 2019).

Obter um melhor entendimento das vias protetoras do SRA, sobretudo da expressão de seus receptores MAS e MRGD, poderia revelar novas estratégias de aferição prognóstica e estratificação preditora de risco para grupos específicos de indivíduos. Além do mais, torna-se pertinente o reconhecimento e análise da expressão desses receptores para a elucidação da COVID-19 e traçar novas estratégias para melhor condução desta patogenia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a expressão gênica do MAS e MRGD no epitélio nasal de indivíduos com obesidade infectados pelo SARS-CoV-2 no município de Diamantina-MG.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil epidemiológico da amostra do município de Diamantina, Minas Gerais.
- Comparar a expressão gênica de MAS e MRGD no epitélio nasal entre indivíduos com obesidade e eutróficos.
- Correlacionar a expressão gênica de MAS e MRGD no epitélio nasal de indivíduos infectados e não infectados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFVJM, sendo registrado na base nacional e unificada de registros de pesquisas Plataforma Brasil, pelo número (CAAE: 55519822.4.0000.5108 e 34189420.2.0000.5108) e obedeceu aos princípios éticos para pesquisas envolvendo seres humanos previstos na Resolução do Conselho Nacional de Saúde no 466.

Os indivíduos que participaram foram informados sobre os objetivos, metodologia, os possíveis riscos em relação à participação na pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A). As amostras biológicas coletadas foram identificadas por códigos para preservar a identidade dos pacientes.

5.2 Delineamento Experimental

Trata-se de um estudo observacional, analítico de caso-controle realizado na cidade de Diamantina- MG, que avaliou a quantificação da expressão dos genes dos receptores MAS e MRGD em adultos infectados pelo SARS-CoV-2, por RT-qPCR em amostras de nasofaringe. A pesquisa constituiu-se de dois grupos: o grupo experimental (caso) incluiu indivíduos com obesidade e eutróficos com diagnóstico molecular positivo para COVID-19 e sintomáticos; e o grupo controle incluiu indivíduos com obesidade e eutróficos com diagnóstico molecular negativo para COVID-19 e sem sintomas gripais.

Inicialmente os pacientes que fizeram teste para COVID-19 foram cadastrados em formulários do REDELAB COVID-19 - UFVJM, a qual faz parte e é coordenada pela Fundação Ezequiel Dias (Funed). Em seguida, procedeu-se com levantamentos de dados para seleção por conveniência incluindo nome, endereço, telefone, sexo, idade peso, altura, índice de massa corporal (IMC), raça e medicamentos em uso, além de outras informações relevantes ou que impossibilitem a participação na pesquisa.

O estudo foi realizado no Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq - Saúde) da UFVJM utilizando os Laboratórios de Biologia do Exercício e Imunometabolismo (BioEx) e de Doenças Infecto-Parasitárias (LADIP), em parceria com o Laboratório Escola de Análises Clínicas (LEAC). No LEAC foram realizados os diagnósticos

para COVID-19 e extração de RNA total. No LADIP foram realizadas as coletas de amostras de nasofaringe, a síntese de Ácido Desoxirribonucleico Complementar (cDNA) e a preparação dos experimentos para a RT-qPCR. No BioEx foi realizada a RT-qPCR e o armazenamento de cDNA.

5.2.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos indivíduos de ambos os sexos maiores de 18 anos. Participaram do grupo experimental indivíduos com diagnóstico molecular positivo para COVID-19 até o 8º dia de início dos sintomas. O grupo controle foi constituído de indivíduos com diagnóstico molecular negativo para COVID-19 e assintomáticos.

5.2.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos indivíduos menores de 18 anos; que passaram por processo de imunização nos 30 dias anteriores à realização do estudo; que experimentaram quadro infeccioso nos 15 dias anteriores ao estudo; indivíduos submetidos a tratamento dietoterápico nos 6 meses anteriores ao período do estudo; e que tivessem praticado atividade física regular nos 6 meses anteriores ao período do estudo.

5.3 Coleta de Dados

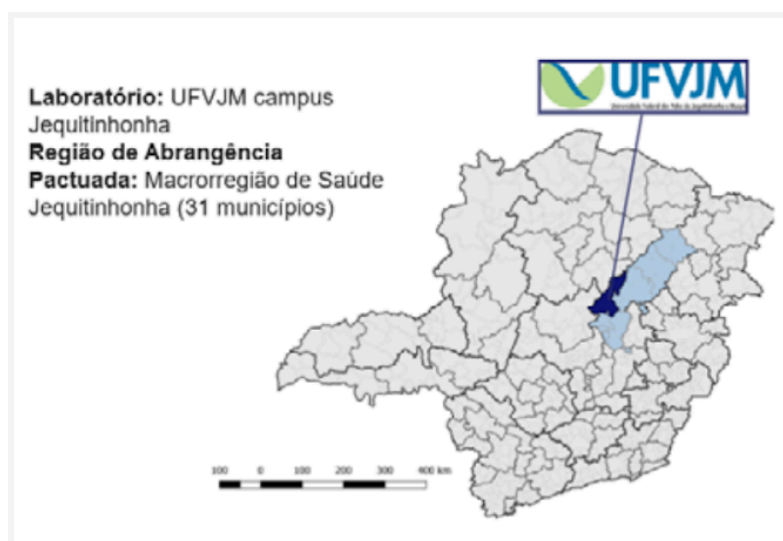
A coleta das amostras biológicas de swab de nasofaringe para detecção do SARS-CoV-2 seguiu o protocolo do Manual do Diagnóstico da COVID-19 (GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2021). Após a coleta, os swabs foram mergulhados em tubo contendo meio de cultura líquida de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab, Campinas, Brasil) e posteriormente armazenados a -80 °C até a etapa seguinte (BUSTIN *et al.*, 2009).

Os dados clínicos dos participantes do grupo experimental foram obtidos a partir de prontuários contendo informações necessárias para a caracterização da amostra. Estes prontuários foram estruturados pela equipe do Bioex para a REDELAB COVID-19 - UFVJM. Os dados clínicos dos participantes do grupo controle foram obtidos no momento anterior à coleta do swab nasofaríngeo.

5.4 Diagnóstico da COVID-19

Os diagnósticos da COVID-19 foram feitos no LEAC da UFVJM (Campus Jequitinhonha) (FIG. 4), pois trata-se de um laboratório habilitado e referência na rede pública de Minas Gerais (GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2021). A técnica executada foi por RT-qPCR e seguiu instruções da Allplex™ 2019-nCoV Assay (Seegene, Sankt. Ingbert, Germany) (BUSTIN *et al.*, 2009).

Figura 4 - Centro colaborador em atividade e região de abrangência pactuada.



Adaptado de: Governo do Estado de Minas Gerais, 2021.

5.5 Extração de RNA

Extrações totais de RNA das amostras de swab de nasofaringe foram realizadas com uso do kit Viral - Kit Purelink (Invitrogen, Carlsbad, USA), seguindo instruções do fabricante.

Resumidamente, em eppendorfs devidamente identificados, contendo tampão de lise e controle interno (220 μ L), foram adicionados 200 μ L da respectiva amostra e homogeneizados em agitador vórtex por 15 segundos. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de etanol (96 -100%) aos eppendorfs e novamente agitou-se por 15 segundos.

O volume total dos eppendorfs (620 μ L) foram transferidos para colunas, também identificadas, imediatamente acopladas a tubos e centrifugadas a 12.000 x g por 15 segundos. Posteriormente, descartou-se os filtrados e as colunas foram transferidas para novos tubos coletores onde foi adicionado 700 μ L de reagente de lavagem às colunas e centrifugadas a

12.000 x g por 15 segundos. O mesmo processo foi repetido duas vezes, porém contendo 500 µL de reagente de lavagem contendo etanol.

Após a última centrifugação, descartou-se os filtrados e novamente foi centrifugado a 12.000 x g por 1 minuto utilizando os mesmos tubos coletores. A partir de então, as colunas foram transferidas para outro eppendorfs identificados, onde foi adicionado 60 µL de água livre de DNase/RNase e incubados por 1 minuto. Finalmente, os eppendorfs foram centrifugados a 12.000 x g por 2 minutos.

A incubação e todas as centrifugações foram realizadas em temperatura ambiente. O RNA extraído foi armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado para a síntese de cDNA (BUSTIN *et al.*, 2009).

5.6 Escolha de Primers

Os primers utilizados no estudo foram desenhados nos sites da “Reference Sequence Database (RefSeq) - National Center for Biotechnology Information (NCBI)” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) e da “University of California Genome Browser Home” (<https://genome.ucsc.edu/>) e posteriormente analisados na literatura.

Os genes MAS e MRGD foram obtidos da Integrated DNA Technologies (Coralville, EUA) e utilizados como alvos; o gene Beta-Actina (β-Act.) foi obtido da mesma empresa e utilizado como referência de acordo com o método de quantificação relativa $2^{-\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os primers foram testados quanto a suas eficiências em amostras de cDNA para encontrar as condições ideais de temperatura e concentração. A Tabela 1 apresenta as informações sobre os primers (BUSTIN *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Detalhamento dos primers utilizados para as reações de qPCR

Genes	Primer Forward/ Reverse	Referência
β-Act.	5' - CCAACCGCGAGAAGATGA - 3' 5' - CCAGAGGCGTACAGGGATAG - 3'	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011
MAS	5' - GCTACACGGGCCTCTATCTG - 3' 5' - TACTCCATGGTGGTCACCAGGC - 3'	BADER <i>et al.</i> , 2018 ERFINANDA <i>et al.</i> , 2020
MRGD	5' - CCGTGGAGTCAGCCCTAAAC - 3' 5' - CAGAAGGGGTTCCCTGTGCAT - 3'	DA

β-Act.: Beta-Actina; MAS: Receptor MAS; MRGD: Receptor acoplado à proteína G Relacionado ao Mas - Tipo D; DA: Desenhado pelos autores.

5.7 Síntese de cDNA

Para cada RNA total extraído, foi sintetizado seu respectivo cDNA. Para o grupo experimental, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit iScript™ Select cDNA Synthesis (Bio - Rad, Alfred Nobel Drive Hercules, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 2. Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado e colocado em um termociclador usando o protocolo descrito na Tabela 3.

Tabela 2. Reagentes e volumes usados na reação de cDNA Kit Bio - Rad

Reagentes	Volume por reação (µL)
5x iScript Reaction Mix	N x 4 µL
iScript Reverse Transcriptase	N x 1 µL
Água livre de Nuclease	N x 6 + 10% µL
Amostras de RNA	N x 9 µL
Volume Final	N x 20 µL

N = Número de amostras; µL: Microlitros

Tabela 3. Protocolo de reação para síntese de cDNA Kit Bio - Rad

Etapa	Tempo (min) Temperatura (°C)
Incubação	5 min em 25 °C
Transcrição Reversa	20 min em 46 °C
Inativação da Transcrição Reversa	1 min em 95 °C

min: minutos; °C: Graus Celsius

Para sintetizar o cDNA do grupo controle, utilizou-se o kit cDNA Synthesis Kit with RNase Inhibitor (Cellco, São Carlos, Brasil) para os mesmos genes do grupo experimental sendo eles os genes alvos MAS e MRGD e o gene referência β -Act. Os reagentes utilizados na reação e suas respectivas concentrações estão detalhados na Tabela 4. Da mesma forma, foi feita a homogeneização do conteúdo e, em seguida, foram colocados em termociclador usando o protocolo descrito na Tabela 5. Posteriormente, todas as amostras de cDNAs

sintetizadas foram identificadas de forma adequada e mantidas a -20°C até a utilização nas reações de RT-qPCR (BUSTIN *et al.*, 2009).

Tabela 4. Reagentes e volumes usados na reação de cDNA Kit Cellco

Reagentes	Volume por reação (μL)
SCRIPT RT Buffer 5x	N x 4 μl
Água livre de Nuclease	N x 3,5 + 10 % μl
dNTP Mix	N x 1 μl
DTT stock solution	N x 1 μl
Primer (Random)	N x 0,5 μl
Rnase Inhibitor	N x 0,5 μl
SCRIPT Reverse Transcriptase	N x 0,5 μl
RNA Template	N x 9 μl
Total	N x 20μl

N = Número de amostras; μL : Microlitros

Tabela 5. Protocolo de reação para síntese de cDNA Kit Cellco

Etapa	Tempo (min) Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Incubação	10 min em 42°C
Alongamento	40 min em 55°C
Inativação da Transcrição Reversa	10 min em 70°C

min: minutos; $^{\circ}\text{C}$: Graus Celsius

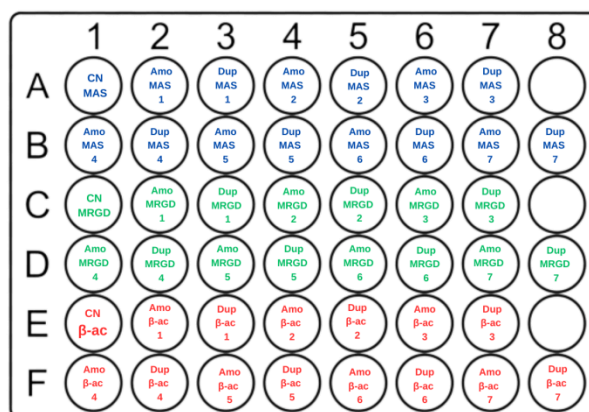
5.8 Quantificação da expressão de MAS e MRGD

5.8.1 Reação de RT - qPCR

As reações foram realizadas segundo recomendações do kit LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Os reagentes e suas respectivas concentrações utilizados estão detalhados na Tabela 6. Inicialmente, foram distribuídos 9 μl dessa mistura em microplaca que continha 48 poços. Em seguida, adicionou-se 1 μl de cDNA

nos poços (FIG. 5). Em cada placa, havia um controle negativo constituído pelos mesmos reagentes citados acima substituindo-se o cDNA por 1 µl de água livre de nuclease. Dessa forma, cada poço continha o volume final de reação de 10 µL.

Figura 5 - Montagem da placa.



Elaborado pelo próprio autor: amostra (Amo); Beta actina (β -ac); Duplicata da amostra (Dup); controle negativo (CN); receptor MAS (MAS); receptor acoplado à proteína G Relacionado ao Mas - Tipo D (MRGD).

Imediatamente após a montagem, a microplaca foi vedada com selante apropriado e, em seguida, esta foi centrifugada por 10 segundos à 500 x g para a completa agregação do cDNA à mistura e remoção de bolhas.

Tabela 6. Reagentes e volumes usados para reação de RT - qPCR

Reagentes	Volume por reação (µL)
Mix Sigma	N x 5 µl
Primer	N x 0,2 µl
Rox	N x 0,1 µl
Água livre de Nuclease	N x 4,7 µl
cDNA da Amostra	1 µl
Total	N x 10µl

N = Número de amostras; µL: Microlitros

As condições utilizadas estavam de acordo com o protocolo indicado pelo StepOne™ Real-Time PCR System (Foster City, CA 94404, USA) para as reações de RT - qPCR sendo:

desnaturação inicial a 95 °C por 20 segundos; seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C, 3 segundos; e posteriormente anelamento/extensão a 60 °C por 20 segundos. Todas as amostras foram executadas em duplicatas, excetuando o controle negativo, o qual não foi observado a amplificação do cDNA (BUSTIN *et al.*, 2009).

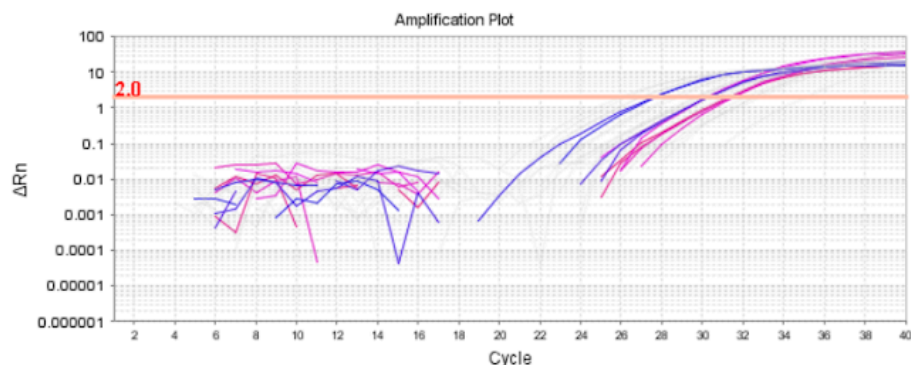
5.8.2 Análise da RT - qPCR

A quantificação dos níveis de expressão de β -Act., MAS e MRGD, referentes à fluorescência acumulada das reações, foram analisados por RT-qPCR em equipamentos do sistema StepOne™ ou StepOne™ PLUS (Applied Biosystems, Waltham, EUA) e posteriormente analisados em gráfico de amplificação da curva por ciclo. Foi utilizada a análise da proporção do número de cópias dos genes alvos entre as amostras, o que caracteriza a quantificação relativa (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Delimitou-se os limiares de ciclos (*CT*) referentes a picos de ciclos comuns entre as curvas de amplificação a partir da diferença entre os sinais emitidos das amostras alvo e do meio (ΔR_n) reportados no eixo das ordenadas, e o número de ciclos reportados no eixo das abscissas (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os thresholds foram escolhidos para o início da fase exponencial da amplificação, sendo eles 2, 2.5 e 3 para β -Act., MAS e MRGD, respectivamente. As médias do número de ciclos dos genes MAS e MRGD foram comparadas em todas as amostras em conjunto por grupos experimental e controle. Os dados foram expressos como uma razão relativa ao nível de β -Act. (FIG. 6) (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Utilizou-se o método $2^{-\Delta CT}$ para esta quantificação relativa. Inicialmente realiza-se o ΔCT que é a diferença dos limiares de ciclos entre os genes de MAS ou MRGD em comparação ao gene de β -Act.. Em seguida, este número torna-se potência para 2., Por fim, foi feito a comparação entre as amostras do grupo caso com as do grupo controle (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Figura 6 - Amplificação de curva em equipamentos do sistema StepOne™.



Elaborado pelo próprio autor: amplification plot: gráfico de amplificação; cycle: ciclo; ΔRn : delta Rn, magnitude do sinal gerado.

5.9 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão para as variáveis contínuas. Para as variáveis categóricas, os dados estão expressos como frequência (percentagem) ou número absoluto. Para a análise descritiva da amostra foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Para as variáveis contínuas, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para determinar a normalidade dos dados. Estas variáveis foram comparadas entre si, sendo elas: expressão de MAS, expressão de MRGD, idade e IMC por ANOVA one-way; sexo e grau de severidade da COVID-19 por teste qui-quadrado; manifestações clínicas, comorbidades prévias, medicações contínuas em uso prévio e necessidade de internação por teste Exato de Fisher; e tempo de internação por teste t não pareado. Foi considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Delimitação da população

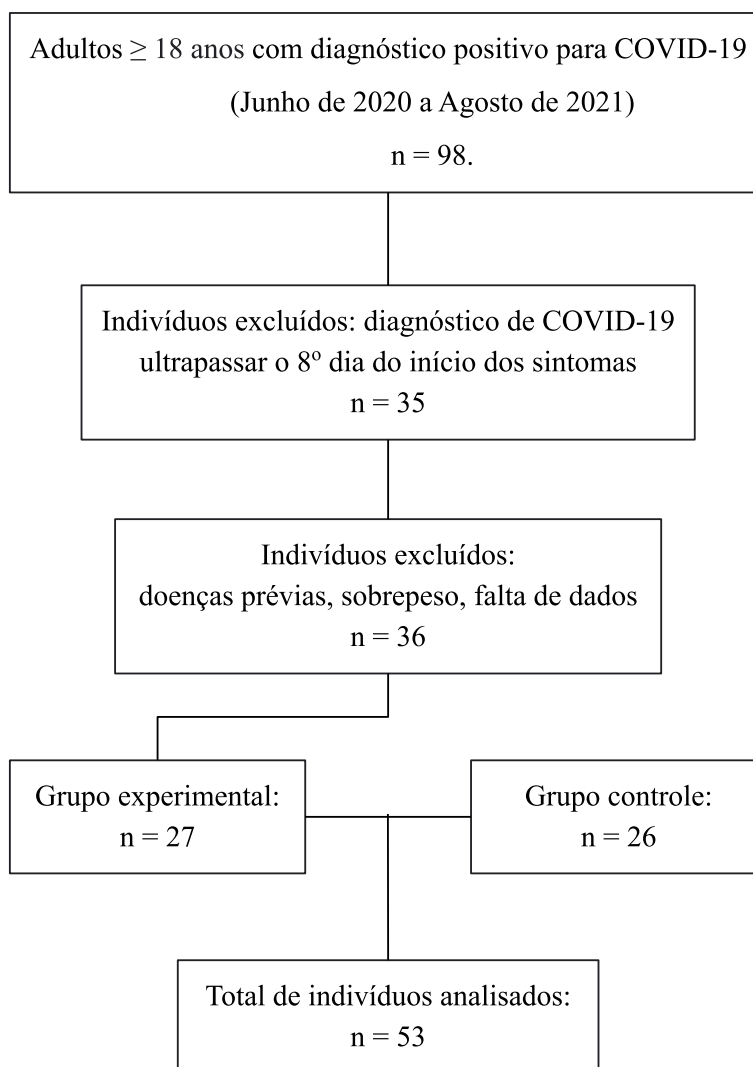
Do total de indivíduos analisados, foram incluídos 53 participantes nesta pesquisa. No período de junho de 2020 a agosto de 2021 foram identificados 98 indivíduos com diagnóstico positivo para COVID-19. Dessa população, 35 indivíduos foram excluídos do estudo devido ao diagnóstico de COVID-19 ultrapassar o 8º dia de início dos sintomas e outros 36 foram excluídos por apresentarem doenças que impossibilitaram a participação,

estarem com sobrepeso ou não terem dados suficientes para a caracterização da amostra. Dessa forma, 27 indivíduos do grupo experimental foram incluídos na pesquisa.

O grupo controle foi constituído por 26 pessoas assintomáticas e híginas com diagnóstico molecular negativo para COVID-19. Trata-se de um grupo pareado ao grupo experimental por sexo e IMC.

As análises das expressões dos genes dos componentes do SRA foram realizadas nos 53 indivíduos incluídos no estudo. A figura 7 demonstra o fluxograma do estudo.

Figura 7 - Fluxograma dos indivíduos participantes do estudo.



Elaborado pelo próprio autor: n = número; ≥ = maior ou igual a.

6.2 Características dos participantes

Dos 27 indivíduos do grupo experimental, 9 (33,33 %) eram eutróficos (EU+), sendo 2 (22,22 %) do sexo masculino e 7 (77,78 %) do sexo feminino. Os indivíduos com

obesidade deste grupo (OB+) correspondiam a 66,67 % dos indivíduos, sendo 33,33 % do sexo masculino e 66,67 % do sexo feminino. A média de idade do grupo OB+ foi de $40,89 \pm 13,39$ anos e a do grupo EU+ foi de $30,00 \pm 10,06$ anos.

Dos 26 indivíduos do grupo controle, 9 (34,61%) eram eutróficos (EU-), sendo que 2 (22,22 %) eram do sexo masculino e 7 (77,78 %) do sexo feminino. Os indivíduos com obesidade do grupo controle (OB-) correspondiam a 17 (65,38%) indivíduos, sendo 5 (29,41 %) do sexo masculino e 12 (70,59 %) do sexo feminino. A média de idade do grupo OB- foi de $42,76 \pm 13,30$ anos ea do grupo EU- foi de $32,00 \pm 7,55$ anos. Não houve diferença entre os grupos experimental e controle em relação à idade (TAB. 7).

Tabela 7. Caracterização quanto ao IMC, sexo e idade dos participantes do estudo.

Variável	N (%) ou Média ± DP	ou	Média ± DP		p
			Máx - Min		
Comp. Corp.	OB+	OB-	EU+	EU-	
Feminino	12 (66,67 %)	12 (77,59 %)	7 (77,78 %)	7 (77,78 %)	ns
Masculino	6 (33,33 %)	5 (29,41 %)	2 (22,22 %)	2 (22,22 %)	ns
Idade	$40,89 \pm 13,39$	$42,76 \pm 13,30$	$30,00 \pm 10,06$	$32,00 \pm 7,55$	ns
IMC	$32,14 \pm 2,37$ 36,70 - 29,90	$36,60 \pm 4,59$ 46,09 - 30,32	$21,28 \pm 2,07$ 23,83 - 18,96	$22,34 \pm 1,93$ 24,28 - 18,73	ns

As variáveis categóricas estão expressas em número absoluto (N) e frequência relativa (%) e as variáveis contínuas estão expressas em média ± desvio padrão, número máximo e mínimo (Máx - Min) ou média ± desvio padrão. Comp. Corp.: composição corporal; DP = desvio padrão; EU: eutróficos; IMC: índice de massa corporal; OB: obesidade; p: índice de significância; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19. Os dados foram comparados para sexo com teste qui-quadrado e para idade e IMC com ANOVA one-way. n = 53.

A média do IMC do grupo OB+ e OB- foi de $32,14 \pm 2,37$ Kg/m² e $36,60 \pm 4,59$ Kg/m², respectivamente, não havendo diferença entre os grupos (p = 0,06). Já a média dos grupos EU+ e EU- foi de $21,28 \pm 2,07$ Kg/m² e $22,34 \pm 1,93$ Kg/m², respectivamente, também não havendo diferença entre eles. As outras comparações foram significativas (p < 0,0001).

6.2.1 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas referidas pelos participantes no ato da testagem para COVID-19 estão dispostas na tabela 8. A tosse (n = 19) e anosmia (n = 19) foram as manifestações clínicas mais prevalentes, em seguida cefaléia (n = 14), febre (n = 14), coriza (n = 13), dispnéia (n = 12), dor no corpo ou mialgia (n = 11) e, por fim, cansaço (n = 10). Não

houve diferença em relação à prevalência dos sinais e sintomas analisados entre os grupos OB+ e EU+.

Tabela 8. Manifestações clínicas predominantes.

Manifestações clínicas	N (%)		p
	OB+	EU+	
Tosse	15 (83,33 %)	4 (44,44 %)	0,0721
Anosmia	12 (66,67 %)	7 (77,78 %)	0,6758
Cefaleia	11 (61,11 %)	3 (33,33 %)	0,2365
Febre	11 (61,11 %)	3 (33,33 %)	0,2365
Coriza	9 (50,00 %)	4 (44,44 %)	> 0,9999
Dispneia	9 (50,00 %)	3 (33,33 %)	0,6828
Dor no corpo / Mialgia	8 (44,44 %)	3 (33,33 %)	0,6924
Cansaço	6 (33,33 %)	4 (44,44 %)	0,6831

As manifestações clínicas estão expressas em número absoluto (N) e frequência relativa (%). A % está relacionada apenas ao grupo OB+ ou EU+ e não ao total de participantes. EU: eutróficos; OB: obesidade; p: índice de significância; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; >: maior que. Os dados foram comparados por Teste Exato de Fisher. n = 27.

6.2.2 Comorbidades prévias

As comorbidades descritas nos prontuários dos pacientes estão demonstradas na tabela 9. O grupo controle foi constituído por indivíduos não infectados que não faziam uso de medicações, formado por obesos e eutróficos negativos para COVID-19 (OB- e EU-). No grupo experimental, observou-se que metade dos OB+ e 7 (77,78%) dos EU+ tinham comorbidades prévias. A comorbidade mais prevalente foi a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) com 7 indivíduos (OB+= 6; EU+= 1). Apenas 2 participantes tinham Diabetes Mellitus (DM) (OB+= 1; EU+= 1) e 2 tinham dislipidemia (OB+= 1; EU+= 1). Nessa amostra, 2 OB+ tinham asma e 2 OB+ tinham Doença Pulmonar obstrutiva crônica ou eram tabagistas. Não houve diferença entre os grupos analisados em relação às comorbidades prévias.

Tabela 9. Comorbidades prévias predominantes.

Comorbidades	N (%)	N (%)	p
	OB+	EU+	
HAS	6 (33,33 %)	1 (11,11 %)	0,36
DM	1 (5,56 %)	1 (11,11 %)	> 0,9999
Dislipidemia	1 (5,56 %)	1 (11,11 %)	> 0,9999
Asma	2 (11,11 %)	0 (0,00 %)	0,5385
DPOC / Tabagismo	2 (11,11 %)	0 (0,00 %)	0,5385

As comorbidades prévias estão expressas em número absoluto (N) e frequência relativa (%). A % está relacionada apenas ao grupo OB+ ou EU+ e não ao total de participantes. EU: eutróficos; OB: obesidade; p: índice de significância; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; >: maior que. Os dados foram comparados por Teste Exato de Fisher. n = 27.

6.2.3 Medicções em uso

Em relação à medicação, 9 indivíduos OB+ e 7 EU+ faziam uso prévio de fármacos contínuos. Dentre as medicações mais prevalentes, observa-se o uso de Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA) (OB+= 9; EU+= 3); Bloqueadores do Receptor de Angiotensina (BRA) (OB+= 5; EU+= 1); Diuréticos (DIU) (OB+= 2; EU+= 1); e Beta Bloqueadores (B-Bloq.) (OB+= 1). Dentre os EU+, duas pessoas não souberam relatar que tipo de medicação utilizavam (TAB. 10).

Tabela 10. Medicções contínuas em uso prévio ao estudo relacionadas aos participantes.

Medicções Contínuas	N (%)	N (%)	p
	OB+	EU+	
IECA	9 (50,00 %)	3 (33,33 %)	0,6828
BRA	5 (27,78 %)	1 (11,11 %)	0,6279
DIU	2 (10,53 %)	1 (11,11 %)	> 0,9999
B-Bloq.	1 (5,26 %)	0 (0,00 %)	> 0,9999

As medicações usadas pelos indivíduos, estão expressas em número absoluto (N) e frequência relativa (%). A % está relacionada apenas ao grupo OB+ ou EU+ e não ao total de participantes. B-Bloq: beta-bloqueadores; BRA: bloqueadores do receptor de angiotensina; DIU: diuréticos; EU: eutróficos; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; OB: obesidade; p: índice de significância; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; >: maior que. Os dados foram comparados por Teste Exato de Fisher. n = 27.

6.3 Grau de severidade da COVID-19 e internação

Em relação à severidade da COVID-19, a maioria dos indivíduos (n = 11) foram classificados apresentando a forma leve da doença (OB+= 6; EU+= 5), 10 foram classificados apresentando doença moderada (OB+= 8; EU+= 2) e 6 participantes apresentando doença grave (OB+= 4; EU+= 1=2). Não houve diferença entre os grupos.

A recuperação em domicílio foi orientada para 10 indivíduos OB+ e para 7 indivíduos EU+. Ao analisar a necessidade de internação, 8 OB+ foram internados e apenas 2 EU+ necessitaram de internação. O tempo de internação não foi significativo entre os grupos, contudo, o maior tempo de internação foi de um paciente OB+ (24 dias). Em relação à amostra completa, apenas 1 pessoa EU+ veio a óbito, todas estas descrições estão contidas na tabela 11.

Tabela 11. Grau de severidade da COVID-19 e tempo de internação.

Variável	OB+	EU+	p
	N (%) ou Média ± DP	N (%) ou Média ± DP	
Grau de COVID-19			1,527
Leve	6 (33,34 %)	5 (55,56 %)	
Moderado	8 (44,45 %)	2 (22,23 %)	
Grave	4 (22,22 %)	2 (22,22 %)	
Internação			0,4059
Sim	8 (44,45 %)	2 (22,22 %)	
Não	10 (55,55 %)	7 (77,78 %)	
Tempo de internação	10,13 ± 2,37	12,5 ± 5,26	0,6641
Desfecho			0,1070
Rec. Domic.	10 (55,55 %)	7 (77,78 %)	
Alta	8 (44,45 %)	1 (11,11 %)	
Óbito	0,00 (0%)	1 (11,11 %)	

As variáveis categóricas estão expressas em número absoluto (N) e frequência relativa (%), e as variáveis contínuas estão expressas em média ± desvio padrão. A % está relacionada apenas ao grupo OB+ ou EU+ e não

ao total de participantes. DP: desvio padrão; EU: eutróficos; OB: obesidade; p: índice de significância; Rec. Domic.: recuperação domiciliar; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; >: maior que. Os dados foram comparados para grau de COVID-19 e desfecho com teste qui-quadrado, para necessidade de internação utilizou-se Teste Exato de Fisher e para tempo de internação teste t não pareado. n = 27.

6.4 Expressão de MAS

A figura 8 demonstra a expressão do gene MAS na mucosa nasofaríngea de indivíduos com obesidade e eutróficos. Observou-se que indivíduos infectados, tanto do grupo dos indivíduos com obesidade quanto do grupo dos eutróficos, expressaram menos MAS em comparação aos não infectados ($p < 0,0001$), havendo efeito do gene em relação à infecção pelo vírus SARS-CoV-2. Ocorreu também uma diminuição da expressão deste gene ao se comparar o grupo de pessoas com obesidade e o grupo dos eutróficos ($p < 0,0001$), sendo verificada, além disso, uma maior expressão de receptores MAS no grupo EU- ($p < 0,0001$). Curiosamente, o oposto também foi observado, pois os indivíduos com obesidade e não infectados expressaram mais receptores MAS em relação aos eutróficos infectados ($p < 0,0001$).

Não houve diferença ($p = 0,9754$) entre os grupos OB+ e EU+, sendo demonstrado uma diminuição da expressão genética desse receptor em ambos os grupos quando infectados. O mesmo foi observado ao analisar os grupos OB- e EU- ($p = 0,7325$).

Figura 8 - Expressão do gene MAS na mucosa nasofaríngea de indivíduos com e sem COVID-19 de acordo com IMC.

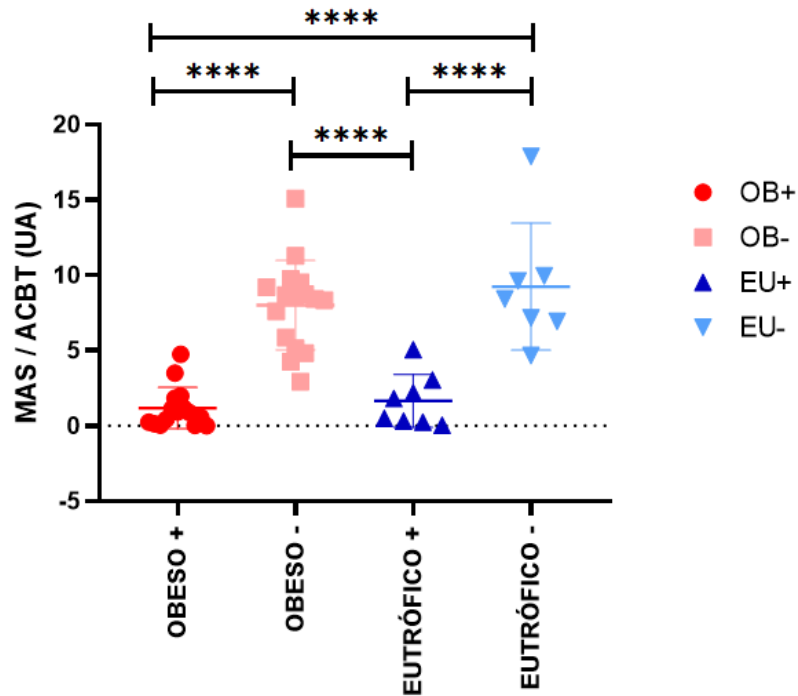


Figura 8: Expressão do gene MAS de acordo com a infecção pelo SARS-CoV-2. ACTB = beta-actina; EU: eutróficos; MAS: receptor MAS; OB: obesidade; UA: unidades arbitrárias; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; ●: pessoas com obesidade positivas para COVID-19; ■: pessoas com obesidade negativas para COVID-19; ▲: pessoas eutróficas positivas para COVID-19; ▼: pessoas eutróficas negativas para COVID-19; ****: $p < 0,0001$. ANOVA one-way.

6.5 Expressão de MRGD

A figura 9 demonstra a expressão do gene do receptor MRGD na mucosa nasofaríngea de indivíduos com obesidade e eutróficos. Nesta análise, observou-se diferença em relação à expressão desse gene e a composição da massa corporal quando os grupos OB- e EU- foram comparados ($p < 0,001$), demonstrando menor expressão nos indivíduos OB-. Pessoas eutróficas sem infecção expressaram mais receptores MRGD quando comparados a EU+ ($p < 0,001$) e OB+ ($p < 0,0001$), demonstrando interferência tanto da infecção pelo SARS-CoV-2 quanto pela composição da massa corporal.

Figura 9 - Expressão do gene MRGD na mucosa nasofaríngea de indivíduos com e sem COVID-19 de acordo com IMC.

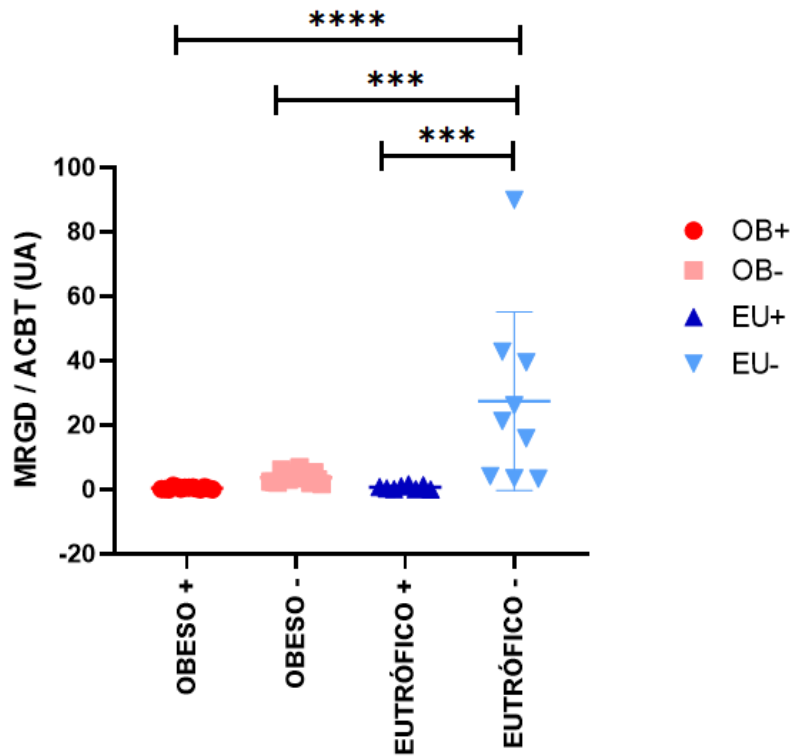


Figura 9: Expressão do gene MRGD de acordo com a infecção pelo SARS-CoV-2. ACTB: beta-actina; EU: eutróficos; MRGD: receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas - Tipo D; OB: obesidade; UA: unidades arbitrárias; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; ●: pessoas com obesidade positivas para COVID-19; ■: pessoas com obesidade negativas para COVID-19; ▲: pessoas eutróficas positivas para COVID-19; ▼: pessoas eutróficas negativas para COVID-19; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. ANOVA one-way.

Ao analisar especificamente o grupo das pessoas com obesidade, foi observado que a infecção pelo SARS-CoV-2 estava relacionada à diminuição da expressão do gene do receptor MRGD entre OB+ e OB- ($p < 0,0001$), com pessoas com obesidade e infectadas expressando menos gene (Fig. 10). Não houve significância ao se comparar apenas os grupos OB+ com EU+ para este gene.

Figura 10 - Expressão do gene MRGD na mucosa nasofaríngea de indivíduos com obesidade em relação à infecção pelo SARS-CoV-2.

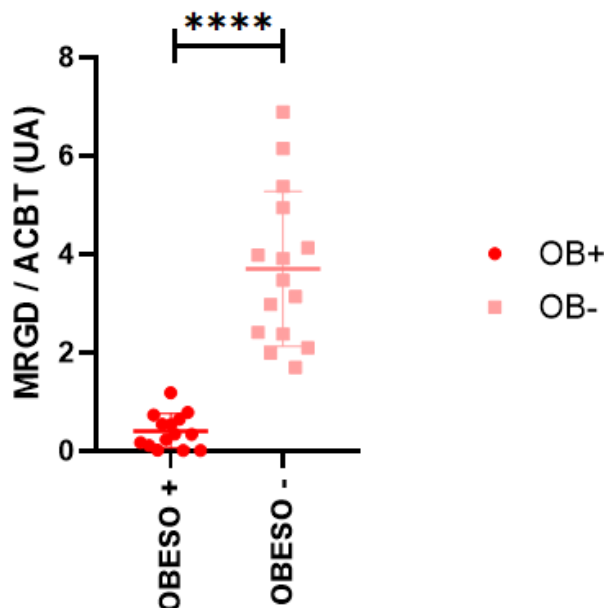


Figura 10: Expressão do gene MRGD de acordo com a infecção pelo SARS-CoV-2. ACTB: beta-actina; EU: eutróficos; MRGD: receptor acoplado à proteína G relacionado ao Mas - Tipo D; OB: obesidade; UA: unidades arbitrárias; +: positivo para COVID-19; -: negativo para COVID-19; ●: pessoas com obesidade positivas para COVID-19; ■: pessoas com obesidade negativas para COVID-19; ▲: pessoas eutróficas positivas para COVID-19; ▼: pessoas eutróficas negativas para COVID-19; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Teste t não pareado.

7. DISCUSSÃO

Até onde se sabe, este foi o primeiro estudo a demonstrar a expressão dos genes dos receptores MAS e MRGD na mucosa nasal do trato respiratório de seres humanos e a comparar tais expressões à composição corporal e à COVID-19. Este estudo evidenciou que tanto a obesidade quanto a infecção por SARS-CoV-2 podem diminuir a expressão desses receptores.

Dentre os indivíduos dessa amostra, o sexo feminino correspondeu a 71,70 % ($n = 38$) e o sexo masculino a 23,30 ($n = 38$), não havendo diferença entre os grupos em relação ao sexo. A idade dos participantes variou entre 32 e 42 anos. No entanto, não houve diferença em relação a essa variável. Arnold discute a hipótese de mulheres serem mais protegidas contra uma infecção por apresentarem uma ação mais expressiva da ECA2. Segundo esta suspeita, este autor discute fatores hormonais e genéticos, uma vez que a ECA2 é codificada no cromossomo X e potencializada pelo estrógeno (D'ARDES *et al.*, 2020). Assim, tanto fatores quantitativos como qualitativos podem aumentar a expressão dessa molécula (ARNOLD, 2020; D'ARDES *et al.*, 2020). Entretanto, estimativas demonstraram que a

proporção de infecção entre os sexos não é significativa. No Brasil, por exemplo, 50,5% da síndrome respiratória aguda grave causada por COVID-19 era correspondente às mulheres (ARNOLD, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE).

A manifestação clínica com maior incidência nesta pesquisa foi a tosse entre os indivíduos OB+ (83,33 %) e a anosmia entre os EU+ (77,78 %). Cefaleia e febre tiveram incidências semelhantes nos dois grupos e, em menor grau, coriza e dispnéia também tiveram incidências iguais entre OB+ e EU+. As manifestações clínicas menos relatadas entre os participantes foram dor no corpo ou mialgia e cansaço. Concordando com nosso estudo, Katoto e colaboradores (2021) demonstraram que em 729 pacientes hospitalizados por COVID-19, o aumento da idade foi associado ao aumento da probabilidade de relatar tosse e febre, sendo que ter idade igual ou superior à 60 anos poderia aumentar em até cinco vezes o risco de mortalidade por COVID-19.

Em relação às comorbidades, a HAS foi mais incidente entre os OB+ (33,33 %), DM e dislipidemia demonstraram apenas um representante em cada grupo, asma e DPOC foram observadas apenas no grupo OB+ com dois representantes para cada comorbidade. Nenhuma comorbidade analisada neste estudo demonstrou diferença entre os grupos OB+ e EU+. De encontro a este estudo, Chen e colaboradores (2019) caracterizaram uma amostra de 799 pacientes internados com COVID-19, mostrando que a HAS crônica e comorbidades cardiovasculares foram mais frequentes entre os 113 pacientes falecidos. Espiritu e colaboradores (2023) analisaram 10.881 pacientes com COVID-19, sendo que 45,1% tinham DM e 33,5% tinham HAS. Contudo, os pacientes com hipertensão tiveram significativamente maiores chances de mortalidade hospitalar. Nossa análise demonstrou que a IECA foi a medicação mais utilizada dentre os OB+ (50%) e EU+ (33,33 %), observando-se ainda a utilização de BRA (27,78 %) e DIU (10,53%) entre os OB+, sendo que apenas um componente desse grupo fazia uso de B-Bloq. Em uma coorte de 16.134 indivíduos positivos para infecção por SARS-CoV-2, 6.517 tinham diagnóstico de HAS e destes 67% utilizavam anti hipertensivos (PAVEY *et al.*, 2022). Contudo, Pavey e colaboradores (2022) revelaram que o uso de IECA ou BRA não se associavam ao risco de desenvolvimento de COVID-19 grave.

Não houve diferença em relação ao IMC entre os grupos de EU+ e EU- ($p = 0,9118$) e entre os grupos OB+ e OB- ($p = 0,0616$). Tong e colaboradores (2023) realizaram um estudo prospectivo de coorte com 55.299 indivíduos positivos para COVID-19 com média de IMC de $30,5 \pm 7,4$ kg/m². De acordo com esse estudo, pessoas com obesidade grau 2 e 3 e positivas para COVID-19 estavam associadas a maior taxa de hospitalização,

internação em UTI, utilização de ventilação mecânica e mortalidade quando comparadas a indivíduos sem obesidade e positivas para COVID-19. Fernández e colaboradores (2022) analisaram 785 indivíduos positivos para COVID-19, divididos entre grupo de assintomáticos ou com sintomas leves (n=511) e um grupo de pessoas com a forma grave da COVID-19 (n=274). Estes autores consideraram que tanto o Estimador de adiposidade corporal-clínica da Universidade de Navarra (CUN-BAE) quanto o IMC elevados podem aumentar o risco de desenvolvimento de COVID-19 grave.

É sugerido que o tecido adiposo expressa todos os componentes do SRA. Entretanto, a concentração de renina e angiotensinogênio é mantida por mecanismos locais que regulam positivamente o eixo não protetor do RAS, tornando-o superativado durante o excesso crônico de energia em humanos e mediando assim a inflamação característica (FRIGOLET; TORRES; TOVAR, 2013; LELIS *et al.*, 2019; RITTER *et al.*, 2020; KALUPAHANA; MOUSTAID *et al.*, 2012). Observa-se também, o aumento da expressão de ECA2 no tecido adiposo, porém sem proporcional aumento de sua atividade proteica, o que sugere desregulação do eixo protetor na obesidade (KALUPAHANA; MOUSTAID *et al.*, 2012).

Nessa perspectiva, a obesidade pode causar variações no RAS local e possivelmente predispor um indivíduo ao desenvolvimento grave da COVID-19. Ting e colaboradores (2023) revisaram a relação *in vitro* entre o RAS no tecido adiposo de humanos e suas repercussões durante a infecção do SARS-CoV-2. Curiosamente, apesar de demonstrarem papéis importantes e ativos dos componentes do RAS durante a inflamação em nível de mRNA e proteína, também verificaram a carência de pesquisas abordando o eixo Ang-(1-7)/MAS e sua relação com o tecido adiposo.

Favre e colaboradores (2021), observaram que o aumento da gordura visceral está associada a formas graves de COVID-19. Colón e colaboradores (2022) detectaram a presença de SARS-CoV-2 no tecido adiposo de pulmão, coração e rim em pacientes falecidos, além de demonstrarem a infecção em adipócitos e macrófagos *in vitro* de demais pacientes submetidos à cirurgia bariátrica ou cardiotorácica, comprovando que há inflamação.

Assim, a alteração intrínseca dos componentes do SRA tem potencial para modular a morfofuncionalidade do tecido adiposo, alterando o comportamento celular, estimulando aumento do estresse oxidativo e consequente inflamação local e sistêmica (FAVRE; ESNAULT; OBBERGHEN, 2015; FREITAS. *et al.*, 2022).

A obesidade, por ser um estado inflamatório de baixo grau, pode vir a se tornar uma hiperinflamação quando ocorre a infecção por SARS-COV-2. É sugerido que quando há a relação dessas duas patologias, obesidade e COVID-19, o SRA pode evoluir para um

desajuste de suas vias, exacerbando a produção de metabólitos pró-inflamatórios, como a Ang II, contrariamente a produção de substâncias antiinflamatória, como o Ang (1-7) (MAGALHÃES et al., 2020; PUCCI et al., 2021; RODRIGUES, 2024).

O nosso estudo não avaliou diferenças na expressão gênica da ECA2 na mucosa nasal entre os grupos experimental e controle. Patel e Verma (2020) analisaram uma coorte de 305 pacientes e observaram que crianças com idade de 4 a 9 anos expressavam menos ECA2 em amostras epiteliais nasais em comparação a crianças de 10 a 17 anos, a adultos jovens de 18 a 24 anos e adultos maiores de 25 anos. É sugerido que a interação do vírus à ECA2 pode ocasionar exaustão dessa proteína, o que desequilibraria o SRA, pendendo a balança para a via ACE/Ang II/AT1 e por consequência impelir a hiperinflamação e manifestação da doença aguda. O decaimento da ECA2 pode ainda diminuir a resposta ECA2/Ang-(1-7)/MAS o que diminui a contrabalança homeostática antiinflamatória (D'ARDES *et al.*, 2020).

A expressão da ECA2 aumentou decorrente ao aumento da faixa etária quando comparado para sexo e asma. Schwaighofer e colaboradores (2021) observaram o aumento sérico de ECA2, de Ang-(1-7) e da proporção de Ang-(1-7) em relação ao Ang II em pacientes hospitalizados com COVID-19 grave durante o curso da doença, sendo todos os achados associados à elevação de IL-6. Martins e colaboradores (2021) também ratificaram aumento significativo dos níveis sanguíneos de Ang-(1-7) em pacientes com COVID-19 em relação a voluntários não infectados. Esses achados sugerem que há uma facilitação da atividade da via protetora do RAS, uma vez que Ang-(1-7) encontra-se aumentada em indivíduos positivos para COVID-19.

No entanto, esse fenômeno não é consenso na literatura. Carpenter e colaboradores (2022) relataram a diminuição da Ang-(1-7) em pacientes com COVID-19 em comparação com os indivíduos controle correlacionada com a gravidade da doença. Essa diminuição foi associada a pacientes que necessitaram de hospitalização e oxigenoterapia, mas não para aqueles que se recuperaram e não utilizaram ventilação mecânica. Resultados semelhantes de diminuição sérica de Ang-(1-7) em pacientes com COVID-19 foram encontrados em outro estudo (Henry *et al.*, 2021). Apesar do nosso estudo não avaliar a concentração de Ang-(1-7) ou alamandina, observamos que há diminuição de seus receptores na mucosa nasal dos indivíduos avaliados. Apesar de alguns estudos demonstrarem o aumento sérico desses peptídeos é necessário mais pesquisas analisando a expressão e atividade de seus receptores em diversos órgãos e tecidos, sobretudo o tecido adiposo.

Os grupos dos OB- e EU- expressaram mais o receptor MAS do que o grupo dos OB+ ($p < 0,0001$) na mucosa nasal. Em outra análise, houve diferença entre os grupos EU+ e EU-

($p < 0,0001$), sendo o grupo dos EU- apresentando maior expressão. Esses dados revelam que tanto a obesidade quanto a infecção podem desempenhar um papel negativo na expressão desse gene. Curiosamente, os indivíduos OB- expressaram mais genes do receptor MAS em comparação ao grupo dos EU+, exprimindo o impacto da infecção por SARS-CoV-2 na dinâmica do RAS e, possivelmente, na característica pró-inflamatória da patogenia da COVID-19.

Meng e colaboradores (2014) ao avaliarem o eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS em ratos Wistar, observaram que a infusão crônica de Ang-(1-7) diminuiu significativamente a fibrose pulmonar induzida por sulfato de bleomicina (BLM) em comparação com o grupo controle e o tratado com Ang-II. Nessa premissa, no grupo tratado com Ang-(1-7) houve menores níveis de RNAm de proteína α -colágeno I, fator de crescimento do tecido conjuntivo, α -actina do músculo liso, maior taxa de apoptose de fibroblastos, além de maior inibição da via MAPK/NF- κ B e conseqüente inferior crescimento celular e a inflamação contribuindo assim em inferior quantidade de colágeno pulmonar.

Shenoy e colaboradores (2010) observaram a interferência protetora do eixo ECA2/Ang-(1-7)/MAS em modelos animais com fibrose pulmonar estimulada por BLM. A administração de lentivírus contendo gene de Ang-(1-7) e ou cDNA de ECA2 causou a superexpressão desses componentes no tecido pulmonar de ratos infectados em comparação ao controle. Esse efeito foi determinante para a proteção contra o desenvolvimento de fibrose pulmonar e da supressão da fibrogênese pela significativa diminuição de fator transformador de crescimento β (TGF- β) e redução de citocina pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) com aumento de citocina antiinflamatória (IL-10).

Magalhães e colaboradores (2020) demonstraram a presença de receptores MAS em áreas finas do epitélio brônquico e do músculo liso de Camundongos BALB sensibilizados com ovalbumina e tratados com Ang-(1-7), observando redução da remodelação das vias aéreas, proliferação, recrutamento e sobrevivência de células inflamatórias em regiões peribrônquica, perivascular e alveolar. Os receptores MAS também são expressos no parênquima e estroma do tecido pulmonar humano como células epiteliais das vias aéreas, da musculatura lisa, em células imunológicas e em fibroblastos que, quando ativados, causam efeito protetor relacionado à inflamação e remodelação tecidual (GREGÓRIO *et al.*, 2021; MAGALHÃES *et al.*, 2020). Em seres humanos com COVID-19, a administração de fármacos sintéticos de Ang-(1-7) ou de bloqueadores de Ang II não tiveram resultados conclusivos ou significantes em relação a necessidade de utilização de oxigênio ou impactos na mortalidade (ROBBINS *et al.*, 2023; SELF *et al.*, 2023; WAGENER *et al.*, 2022).

Em relação ao MRGD, conseguimos comprovar que tanto a obesidade quanto a infecção por SARS-CoV-2 são variáveis que interferem na expressão desse gene. Observa-se que houve diferença quando se compara os grupos EU+ em relação aos EU- ($p = 0,0003$), observado uma diferença de médias de 26,69 de maior expressão para aqueles negativos para COVID-19. Quando se analisa apenas o grupo controle, ou seja, negativo para COVID-19, foi evidenciada apenas a variável composição corporal correlacionada à diferença de expressão deste receptor. Dessa forma, EU- expressaram mais MRGD em relação aos OB-. O mesmo ocorre quando se defrontam os grupos EU- e OB+, novamente sendo uma expressão maior para os eutróficos. Em análise separada, também observou-se diferença entre OB+ e OB-. Nesta situação, além da obesidade como fator de redução da expressão de MRGD nos dois grupos, aqueles infectados pelo SARS-CoV-2 expressaram menos receptores.

Fernandes e colaboradores (2021) mostraram que existe efeito potente no tratamento com ALA em ratos Wistar com fibrose cística causada por infusão de BLM. Nesse estudo, houve preferência por deposição de colágeno em regiões das vias aéreas e ao redor dos vasos sanguíneos em detrimento ao interstício do tecido pulmonar, além de demonstrar uma melhor complacência dinâmica em modelos animais tratados com ALA, caracterizando uma preservação da mecânica respiratória.

Em modelos semelhantes de fibrose cística, Liu e colaboradores (2021) observaram que a infusão da ALA resultou em menor deposição de colágeno no interstício pulmonar assim como menor expressão de radicais livres para oxidação, desenvolvimento da fibrogênese, além de induzir autofagia protetora e neutralizar os efeitos da Ang II atenuando a fibrose pulmonar induzida por BLM em camundongos C57B/6. O efeito da ALA está associado ao seu receptor MRGD que no pulmão é principalmente encontrado nos fibroblastos (LIU et al., 2021). Contudo, existe a necessidade de novos estudos para investigar outros locais de ancoragem do receptor MRGD.

Wang e colaboradores (2023) descobriram resultados semelhantes em modelos animais ao analisar, *in vitro*, o eixo ALA/MRGD identificando níveis menores de proteína e mRNA nos marcadores de fibroblastos, colágeno I e α -actina de músculo liso em fibroblastos pulmonares de camundongos tratados com ALA relacionados à funcionalidade do MRGD. O efeito do tratamento também demonstrou atenuar os níveis de ácido láctico extracelular, mitigar a influência do TGF- β e reprimir a glicólise por meio da promoção da mitofagia. Portanto, tendo todos esses elementos determinantes para a ativação dos fibroblastos teciduais alterados negativamente pela ação do eixo ALA/MRGD, tornam-se necessários

estudos que concentrem mais esforços na atuação, localização e disposição do receptor MRGD.

Em estudo envolvendo humanos, Sipriani e colaboradores (2019) demonstraram a diminuição da ALA sérica em indivíduos com fibrose pulmonar idiopática comparado aos controles não infectados. Contudo, não houve diferença significativa entre os grupos em relação às concentrações plasmáticas de Ang I, Ang II e Ang-(1-7), o que diverge de outros estudos já mencionados. Dessa forma, a interação entre ALA e o receptor MRGD, sobretudo em macrófagos e fibroblastos, denota a importância do estudo desse receptor no decurso de doenças inflamatórias favoráveis ao desenvolvimento de processos fibróticos (FERNANDES *et al.*, 2019).

É proposto que a COVID-19 cause desbalanço de componentes do SRA, como ECA2, Ang II, Ang-(1-7) e ALA resultando em fibrose pulmonar intersticial e subsequente desconforto respiratório agudo (SOLTANI; JAVANMARDI *et al.*, 2021). Sabe-se dessa maneira, que o eixo protetor do SRA influencia a resposta inflamatória por modelar negativamente a expressão e liberação de citocinas, a migração de leucócitos e a fibrogênese (SIMÕES *et al.*, 2013). Indivíduos que apresentam menor expressão do receptor MAS ou MRGD, podem estar evidentemente mais expostos aos efeitos deletérios da patogênese inflamatória gerada pela COVID-19 quando há desregulação da via de sinalização protetora, tanto em aspectos iniciais, quanto em processos crônicos da Síndrome Pós-COVID-19, sendo uma das consequências o desenvolvimento de fibrose progressiva (DEAN *et al.*, 2021; DELPINO; FERNANDES *et al.*, 2021; FERNANDES *et al.*, 2022; QUARLERI *et al.*, 2020; NEHME *et al.*, 2019; PUCCI *et al.*, 2021; SELTZER 2020).

A inflamação é um processo importante para o restabelecimento da homeostase, ocasiona a morte programada de células inflamatórias e ativa o perfil de outras células imunológicas que contribuem na resolução de algumas doenças inflamatórias. Carvalho e colaboradores (2019) avaliaram o efeito da Ang-(1-7) e ALA, moléculas sinalizadoras dos receptores MAS e MRGD respectivamente, em relação à inflamação. Para esse propósito, os autores isolaram e cultivaram em *in vitro* macrófagos de camundongos FVB/N para fenótipos de repouso (M0), inflamatórios (M1) e macrófagos anti-inflamatórios (M2). Observaram tendência fenotípica dos macrófagos para um perfil com menor características inflamatórias correlacionado com tais receptores e concentração *in vitro*. Tanto a Ang-(1-7) quanto a ALA não afetaram a expressão em M0. Contudo, na concentração de 10^{-7} os peptídeos desencadearam respostas anti-inflamatórias em M1 e potencializaram a funcionalidade de M2.

Na proposta de estimar tais efeitos *in vivo*, o mesmo estudo utilizou camundongos BALB/c para avaliar os efeitos de Ang1-7 e ALA nas populações de neutrófilos e macrófagos após indução de pleurite por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. Durante o pico de inflamação da pleurite, quando há predominância de M1, a administração dos peptídeos relatados não modificou o número total de migração de leucócitos ou aumentou o perfil de M2, porém diminuíram o número de neutrófilos na pleura assim como a frequência e número de M1 (CARVALHO *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que pode haver processos de perda de autotolerância para GPCR e outras moléculas ligadas ao RAS após infecção do SARS-CoV-2 (AKBARI *et al.*, 2023; CABRAL *et al.*, 2022; D'ARDES *et al.*, 2020). Foi observado que autoanticorpos direcionados GPCR fazem parte da dinâmica da homeostase fisiológica e imunológica corporal (CABRAL *et al.*, 2022). Contudo, em pacientes com COVID-19 moderada e grave os autoanticorpos contra receptores MAS, AT1 e ECA2, por exemplo, perfazem níveis plasmáticos significativamente maiores do que pacientes com a doença leve ou até mesmo em relação ao grupo controle (AKBARI *et al.*, 2023; CABRAL *et al.*, 2022). Então, é proposto que a COVID-19 em humanos, pode ser uma doença autoimune que pode alterar a homeostase do SRA por ter como alvo suas moléculas, causando assim uma alteração sistêmica dentro do processo patológico. Esse ponto de vista pode explicar, de certa forma, a diminuição dos receptores MAS e MRGD observados neste estudo, no entanto, mais pesquisas devem ser feitas no intuito de relacionar autoanticorpos e tais receptores em diversos tecidos, dentre eles o adiposo ou o parênquima pulmonar.

O nosso estudo possui algumas limitações sendo, a primeira delas, o número de indivíduos. Apesar de Diamantina ser o centro de referência para diagnóstico da COVID-19, as informações nos prontuários ficavam a cargo dos profissionais da saúde que não faziam parte da REDELAB COVID-19 – UFVJM. Portanto, alguns prontuários não continham informações suficientes para incluir os indivíduos no estudo. Ademais, neste estudo não relacionamos a expressão dos genes MAS e MRGD da mucosa nasal com o tecido adiposo dos pacientes. Mais estudos são necessários para esclarecer o comportamento desses receptores no organismo humano saudável e naqueles diante a desafios patológicos, como na obesidade e nos distúrbios metabólicos. Não obstante, o presente estudo conseguiu dados inéditos sobre o SRA e sua contribuição para o esclarecimento da fisiopatologia acerca da COVID-19.

8. CONCLUSÃO

Indivíduos com obesidade ou infectados pelo vírus SARS-CoV-2 demonstram menor expressão dos genes MAS e MRGD na mucosa do trato respiratório superior, o que pode contribuir para um desbalanço da homeostase dos componentes do SRA e gerar um ambiente orgânico mais pró-inflamatório o que pode proporcionar maior risco de desenvolvimento da COVID-19 grave.

REFERÊNCIAS

ARMALY, Z.; KINANEH, S.; SKORECKI, K. Renal Manifestations of Covid-19: Physiology and Pathophysiology. **J Clin Med**, v. 10 (6): p. 1216, 2021. doi: 10.3390/jcm10061216.

ARNOLD, R. H. COVID-19 – Does This Disease Kill Due to Imbalance of the Renin Angiotensin System (RAS) Caused by Genetic and Gender Differences in the Response to Viral ACE 2 Attack? **Heart, Lung and Circulation**. 29 (7), 964 - 972, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2020.05.004>.

ARORA, R. *et al.* Constitutive, Basal, and β -Alanine-Mediated Activation of the Human Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D Induces Release of the Inflammatory Cytokine IL-6 and Is Dependent on NF- κ B Signaling. **Int J Mol Sci**, 22 (24): 13254, 2021. doi: 10.3390/ijms222413254. PMID: 34948051; PMCID: PMC8703779.

AKBARI, A. *et al.* COVID-19, G protein-coupled receptor, and renin-angiotensin system autoantibodies: Systematic review and meta-analysis. **Autoimmunity Reviews**. 22 (9): 103402, 1568-9972, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2023.103402>.

AKSOY, H.; KARADAG, A. S.; WOLLINA, U. Angiotensin II receptors: Impact for COVID-19 severity. **Dermatol Ther**. 33 (6): e13989, 2020. doi: 10.1111/dth.13989.

BADER, M. *et al.* Mas and Its Related G Protein-Coupled Receptors, Mrgprss. **Pharmacol Rev**. 66 (4): 1080-105, 2014. doi: 10.1124/pr.113.008136. PMID: 25244929.

BADER, M. *et al.* The Meaning of Mas. **Hypertension**, 72(5), 1072–1075, 2018. doi:10.1161/hypertensionaha.118.10918.

BARROSO, L. C. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. **Frontiers in Immunology**. 8: p. 1596, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01596.

BEYER, D. K.; FORERO, A. Mechanisms of Antiviral Immune Evasion of SARS-CoV-2. **Journal of Molecular Biology**, 167265, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167265>.

BITKER, L. BURRELL, L. M. Classic and Nonclassic Renin-Angiotensin Systems in the Critically Ill. **Crit Care Clin.** 35 (2): 213-227, 2019. doi: 10.1016/j.ccc.2018.11.002.

BORCZUK, A. C.; YANTISS, R. K. The pathogenesis of coronavirus-19 disease. **J Biomed Sci**, v. 29, n. 87, 2022. doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00872-5>.

BRUSCOLI, S. *et al.* Glucocorticoids and COVID-19. **Pharmacol Res.** 185: 106511, 2022. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106511.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.* **Clinical Chemistry.** 55 (4): 611–622, 2009. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CABRAL, M. O. *et al.* Autoantibodies targeting GPCRs and RAS-related molecules associate with COVID-19 severity. **Nat Commun.** 9; 13 (1): 1220, 2022. doi: 10.1038/s41467-022-28905-5.

CARPENTER, R. M. *et al.* Repressed Ang 1–7 in COVID-19 Is Inversely Associated with Inflammation and Coagulation. **mSphere.** 7: 4; 00220-22, 2022. doi: 10.1128/msphere.00220-22.

CARVALHO, S. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) and Alamandine Promote Anti-inflammatory Response in Macrophages *In Vitro* and *In Vivo*. **Mediators Inflamm.** 2019: 2401081, 2019. doi: 10.1155/2019/2401081.

CHADAGA, K. *et al.* Clinical and Laboratory Approach to Diagnose COVID-19 Using Machine Learning. **Interdiscip Sci Comput Life Sci**, v. 14, p. 452–470, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12539-021-00499-4>.

CHEN, T., *et al.* Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. **BMJ.** 368: m1295, 2020. doi: 10.1136/bmj.m1091.

COLÓN, G. J. M. *et al.* SARS-CoV-2 infection drives an inflammatory response in human adipose tissue through infection of adipocytes and macrophages. **Sci. Transl. Med.** 14, eabm9151, 2022. doi: 10.1126/scitranslmed.abm9151.

COSAR, B. *et al.* SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 63, p. 10-22, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>.

COSTA, L. B. *et al.* Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions With the Renin-Angiotensin System. **Front Cell Dev Biol**, v. 16; 8: 559841, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.559841.

COUTO, P. S. *et al.* Systematic review and meta-analysis of cell therapy for COVID-19: global clinical trial landscape, published safety/efficacy outcomes, cell product manufacturing and clinical delivery. **Front Immunol.** 14: 1200180, 2023. doi: 10.3389/fimmu.2023.1200180.

CROZIER, R. A. *et al.* MrgD Activation Inhibits KCNQ/M-Currents and Contributes to Enhanced Neuronal Excitability. **Journal of Neuroscience**. 27 (16), 4492–4496, 2007. doi:10.1523/jneurosci.4932-06.2007.

D'ARDES D. *et al.* COVID-19 and RAS: Unravelling an Unclear Relationship. **Int J Mol Sci**. 24; 21 (8): 3003, 2020. doi: 10.3390/ijms21083003.

DE LEEUW A. J. M. *et al.* Obesity and its impact on COVID-19. **J Mol Med (Berl)**, 99 (7): p. 899-915, 2021. doi: 10.1007/s00109-021-02072-4.

DEAN, A. Q. *et al.* The fight against COVID-19: Striking a balance in the renin–angiotensin system. **Drug Discovery Today**. 26, 10, 2214-2220, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.04.006>.

DELPINO, M.V.; QUARLERI, J. SARS-CoV-2 Pathogenesis: Imbalance in the Renin-Angiotensin System Favors Lung Fibrosis. **Front Cell Infect Microbiol**. 10: 340, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.00340.

DIETZ W, SANTOS-BURGOA C. Obesity and its Implications for COVID-19 Mortality. **Obesity (Silver Spring)**, v. 28 (6): 1005, 2020. doi: 10.1002/oby.22818.

EL-ARIF, G. *et al.* The Renin-Angiotensin System: A Key Role in SARS-CoV-2-Induced COVID-19. **Molecules**, v. 17; 26 (22): 6945, 2021. doi: 10.3390/molecules26226945.

ETELVINO, G. M., PELUSO, A. A. B.; SANTOS, R. A. S. New Components of the Renin-Angiotensin System: Alamandine and the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D. **Curr Hypertens Rep**. 16, 433, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0433-0>.

ERFINANDA, L. *et al.* Estrogen-mediated upregulation of the Mas receptor contributes to sex differences in acute lung injury and lung vascular barrier regulation. **European Respiratory Journal**, 2000921, 2020. doi:10.1183/13993003.00921-2020.

ESPIRITU, A. I. Clinical outcomes in COVID-19 among patients with hypertension in the Philippine CORONA Study. **Eur J Med Res**. 28: 62, 2023. doi: 10.1186/s40001-022-00969-5.

FAVRE, G. A.; ESNAULT, V. L. M.; OBBERGHEN, E. V. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 308: E435-E449, 2015. doi:10.1152/ajpendo.00391.2014.

FAVRE, G. A. *et al.* Visceral fat is associated to the severity of COVID-19. **Metabolism**. 115: 154440, 2021. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154440.

FERNANDES, R. S. *et al.* Alamandine: A promising treatment for fibrosis. **Peptides**. 157, 170848, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170848>.

FERNANDES, R. S. *et al.* Assessment of Alamandine in Pulmonary Fibrosis and Respiratory Mechanics in Rodents. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. 2021: 9975315, 2021. doi: 10.1155/2021/9975315.

FERNÁNDEZ C. S. *et al.* Gravedad de COVID-19 atribuible a obesidad según IMC y CUN-BAE [Severity of COVID-19 attributable to obesity according to BMI and CUN-BAE. **Semergen**. 48 (8): 101840, 2022. doi: 10.1016/j.semerg.2022.101840.

FERREIRA, A. J. *et al.* Therapeutic implications of the vasoprotective axis of the renin-angiotensin system in cardiovascular diseases. **Hypertension**, 55 (2): 207-13, 2010. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.140145.

FILES, D. C. *et al.* A pilot study to assess the circulating renin-angiotensin system in COVID-19 acute respiratory failure. **American Physiological Society**. 321: L213–L218, 2021. doi:10.1152/ajplung.00129.2021.

FREITAS, D. F. *et al.* Neutrophil extracellular traps (NETs) modulate inflammatory profile in obese humans and mice: adipose tissue role on NETs levels. **Mol Biol Rep**. 49, 3225-3236, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07157-y>.

FRIGOLET, M. E.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. The renin–angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 24 (12): 2003-2015, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.07.002>.

GAMMONE, M. A.; D'ORAZIO, N. COVID-19 and Obesity: Overlapping of Two Pandemics. **Obes Facts**, v. 14 (6): 579-585, 2021. doi: 10.1159/000518386. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34569546; PMCID: PMC8678214.

GARCIA, B. *et al.* The alternative renin-angiotensin system in critically ill patients: pathophysiology and therapeutic implications. **Crit Care**. 20; 27 (1): 453, 2023. doi: 10.1186/s13054-023-04739-5.

GARCÍA, F. P. *et al.* High SARS-CoV-2 Viral Load and Low CCL5 Expression Levels in the Upper Respiratory Tract Are Associated With COVID-19 Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 6, p. 977-982, 2022. doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab604>.

GORBALENYA, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndromerelated coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020. doi: 10.1038/s41564-020- 0695-z.

GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Manual do Diagnóstico da COVID-19, Coordenação Estadual de Laboratórios e Pesquisa em Vigilância**. Versão 4. Minas Gerais, 2021.

GRAÑA, C. *et al.* Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. **Cochrane Database Syst Rev**. 12 (12): CD015477, 2022. doi: 10.1002/14651858.CD015477.

GREGÓRIO, J. F. *et al.* Asthma: role of the angiotensin-(1-7)/Mas (MAS1) pathway in pathophysiology and therapy. **Br J Pharmacol**. 178 (22): 4428-4439, 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/bph.15619>.

HENRY, B. M. *et al.* Coronavirus disease 2019 is associated with low circulating plasma levels of angiotensin 1 and angiotensin 1,7. **J Med Virol**. 93: 678–680, 2021.

HIKMET, F. *et al.* The protein expression profile of ACE2 in human tissues. **Molecular Systems Biology**, v. 16, n. 7, 2020. doi: <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, p. 271–280, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, v. 19 (3): p. 141–154, 2020. doi: [10.1038/s41579-020-00459-7](https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa nacional de saúde 2019**. Informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE; 2020.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID. M. N. The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms. **Crit Rev Biochem Mol Biol**. 47 (4): 379-90, 2012. doi: [10.3109/10409238.2012.694843](https://doi.org/10.3109/10409238.2012.694843).

KANUGULA, A. K., *et al.* Renin-Angiotensin System: Updated Understanding and Role in Physiological and Pathophysiological States. **Cureus**. 21; 15 (6): e40725, 2023. doi: [10.7759/cureus.40725](https://doi.org/10.7759/cureus.40725).

KATOTO, P. D. M. C., *et al.* Clinical features and predictors of mortality among hospitalized patients with COVID-19 in Niger. **Confl Health**. 15, 89, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s13031-021-00426-w>.

KHAZAAL, S. *et al.* The Pathophysiology of Long COVID throughout the Renin-Angiotensin System. **Molecules**, 27 (9): 2903, 2022. doi: [10.3390/molecules27092903](https://doi.org/10.3390/molecules27092903).

KIM, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914-921.e10, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.

KUMARI, M. *et al.* A critical overview of current progress for COVID-19: development of vaccines, antiviral drugs, and therapeutic antibodies. **J Biomed Sci**. 29 (1): 68, 2022. doi: [10.1186/s12929-022-00852-9](https://doi.org/10.1186/s12929-022-00852-9).

KUMARI, M.; HEEREN, J.; SCHEJA, L. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. **Semin Immunopathol**, v. 40, p. 189–202, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0668-3>.

KURIAKOSE, J.; MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. ACE2/Ang-(1-7)/Mas1 axis and the vascular system: vasoprotection to COVID-19-associated vascular disease. **Clin Sci (Lond)**. 9; 135 (2): 387-407, 2021. doi: [10.1042/CS20200480](https://doi.org/10.1042/CS20200480).

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 Pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, p. 270–284, 2022. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.

LELIS, D. F. *et al.* Angiotensin-(1-7), Adipokines and Inflammation. **Metabolism**. 95, 36-45, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.03.006>.

LIU Q, *et al.* Alamandine via MrgD receptor attenuates pulmonary fibrosis via NOX4 and autophagy pathway. **Can J Physiol Pharmacol**. 99 (9): 885-893, 2021. doi: 10.1139/cjpp-2020-0662.

MAGALHÃES, G. S. *et al.* Activation of Ang-(1-7)/Mas Receptor Is a Possible Strategy to Treat Coronavirus (SARS-CoV-2) Infection. **Front. Physiol. Sec. Clinical and Translational Physiology**; 11 - 2020, 2020. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00730>.

MARTINS, A. L. V. *et al.* Increased circulating levels of angiotensin-(1-7) in severely ill COVID-19 patients. **ERJ Open Research**. 7: 00114-2021, 2021; doi: 10.1183/23120541.00114-2021.

MELO, D. B. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036-1045. e9, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>.

MENG, Y. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF- κ B pathway. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 50 (4): 723-36, 2014. doi: 10.1165/rcmb.2012-0451OC.

MILASTA, S. *et al.* Interactions between the Mas-Related Receptors MrgD and MrgE Alter Signalling and Trafficking of MrgD. **Molecular Pharmacology**. 69 (2), 479-491, 2005. doi:10.1124/mol.105.018788.

MIN, Y. Q. *et al.* Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 4217-4225, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.023>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde. **Secretarias Estaduais de Saúde**, Brasil, 2023. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html. Acesso em: 23 nov. 2023.

MORGANSTEIN, T. *et al.* Involvement of the ECA2/Ang-(1-7)/Mas Axis in Pulmonary Fibrosis: Implications for COVID-19. **Int J Mol Sci**. 22 (23): 12955, 2021. doi: 10.3390/ijms222312955.

MSEMBURI, W. *et al.* The WHO estimates of excess mortality associated with the COVID-19 pandemic. **Nature**, v. 613, p. 130-137, 2023. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05522-2>.

NEHME, A. *et al.* An Update on the Tissue Renin Angiotensin System and Its Role in Physiology and Pathology. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**. 6 (2): 14, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/jcdd6020014>.

OLIVEIRA, D. B. *et al.* Basal Activation of Type I Interferons (Alpha2 and Beta) and 2'5'OAS Genes: Insights into Differential Expression Profiles of Interferon System Components in Systemic Sclerosis. **Int J Rheumatol**, 2011: 275617, 2011. doi: 10.1155/2011/275617.

ONAKPOYA, I. J. *et al.* Viral cultures for assessing fomite transmission of SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Hospital Infection**, v. 130, p. 63-94, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.09.007>.

PALUDAN, S. R.; MOGENSEN, T. H. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. **Sci. Immunol**, v. 7, n. 67, 2022. doi:10.1126/sciimmunol.abm5505.

PATEL, A. B.; VERMA A. Nasal ACE2 Levels and COVID-19 in Children. **JAMA**. 323 (23): 2386–2387, 2020. doi:10.1001/jama.2020.8946.

PAVEY, H., *et al.* Primary hypertension, anti-hypertensive medications and the risk of severe COVID-19 in UK Biobank. **PLoS One**. 17 (11): e0276781, 2022. doi: 10.1371/journal.pone.0276781.

PEREIRA, A. C. *et al.* Genetic risk factors and COVID-19 severity in Brazil: results from BRACOVID study. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 18, p. 3021–3031, 2022. doi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac045>.

PONTI, G. *et al.* Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Crit Rev Clin Lab Sci**. 57 (6): 389-399, 2020. doi: 10.1080/10408363.2020.1770685.

POVLSSEN, A. L. *et al.* The Vasoactive Mas Receptor in Essential Hypertension. **Journal of Clinical Medicine**, 9 (1): 267, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm9010267>.

PUCCI, F. *et al.* Quantifying Renin-Angiotensin-System Alterations in COVID-19. **Cells**. 10, 2755, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/cells10102755>.

RAMALINGAM, L. *et al.* The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. **Biochim, Biophys. Acta**, v. 1863, p. 1106–1114, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.07.019>.

RICO, J. M. I.; KIM, B. S.; SABOOR, I. A. Beyond somatosensation: Mrgprs in mucosal tissues. **Neuroscience Letters**, 748, 135689. 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135689>.

RITTER, A. *et al.* Obesity and COVID-19: Molecular Mechanisms Linking Both Pandemics. **International journal of molecular sciences**, 21, 16, 5793, 2020. doi:10.3390/ijms21165793.

ROBBINS, A. J. *et al.* The effect of TRV027 on coagulation in COVID-19: A pilot randomized, placebo-controlled trial. **Br J Clin Pharmacol**. 89: 4, 1495-15, 2023. doi: <https://doi.org/10.1111/bcp.15618>.

ROCHA V. N. Viral replication of SARS-CoV-2 could be self-limitative – The role of the renin-angiotensin system on COVID-19 pathophysiology. **Medical Hypotheses**, v. 145,

N. 110330, 2020. doi:10.1016/j.mehy.2020.110330.

RODRIGUES, C. M. **OBESIDADE E COVID-19: RELAÇÃO POSITIVA ENTRE INFLAMAÇÃO, INTERLEUCINAS E ANGIOTENSINA II**. 2024. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2024.

RONDINI, E. A.; GRANNEMAN, J. G. Single cell approaches to address adipose tissue stromal cell heterogeneity. **Biochem J**, v. 14; 477 (3): p. 583-600, 2020. doi: 10.1042/BCJ20190467.

SANTOS, R. A. *et al.* Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100, 8258–8263, 2003. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.143286910>.

SANTOS, R. A. S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1–7) and Mas: new players of the renin–angiotensin system. **Journal of Endocrinology**, 216 (2), R1-R17, 2013. doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0341>.

SARZANI, R. *et al.* Disequilibrium between the classic renin-angiotensin system and its opposing arm in SARS-CoV-2-related lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 1; 319 (2): L325-L336, 2020. doi: 10.1152/ajplung.00189.2020.

SAWADOGO, W. *et al.* Overweight and obesity as risk factors for COVID-19-associated hospitalisations and death: systematic review and meta-analysis. **BMJ Nutr Prev Health**, v. 19; 5 (1): p. 10-18, 2022. doi: 10.1136/bmjnp-2021-000375.

SCHLEIFENBAUM, J. Alamandine and Its Receptor MrgD Pair Up to Join the Protective Arm of the Renin-Angiotensin System. **Front Med (Lausanne)**, 6: 107, 2019. doi: 10.3389/fmed.2019.00107. PMID: 31245374; PMCID: PMC6579891.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**. 3(6), 1101–1108, 2008. doi:10.1038/nprot.2008.73.

SCHWAIGHOFER, R. R. *et al.* ACE2 elevation in severe COVID-19. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 203: 1191-1196, 2021. doi: <https://doi.org/10.1164/rccm.202101-0142LE>.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Informe Epidemiológico COVID-19, Painel COVID-19 MG; SIVEP-gripe. **Elaboração: Assessoria de Informação/SES-MG**. Disponível em: <https://coronavirus.saude.mg.gov.br/boletim>. Acesso em: 23 nov. 2023.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. **Manual para o Diagnóstico da COVID-19**. Governo do Estado de Minas Gerais, Coordenação Estadual de Laboratórios e Pesquisa em Vigilância e Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais. Versão 7. Minas Gerais, 2023.

SELF, W.H. *et al.* Renin-Angiotensin System Modulation With Synthetic Angiotensin (1-7) and Angiotensin II Type 1 Receptor-Biased Ligand in Adults With COVID-19: Two

Randomized Clinical Trials. **JAMA**. 329 (14): 1170-1182, 2023. doi: 10.1001/jama.2023.3546.

SELTZER, S. Linking ACE2 and angiotensin II to pulmonary immunovascular dysregulation in SARS-CoV-2 infection. **International Journal of Infectious Diseases**. 101: 42-45, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.041>.

SHENOY, V. et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**. 182 (8): 1065-72, 2010. doi: 10.1164/rccm.200912-1840OC.

SHIRZAD, M. *et al.* Targeted therapy in Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Implication from cell and gene therapy to immunotherapy and vaccine. **Int Immunopharmacol**. 111: 109161, 2022. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109161.

SIMÕES, S. A. C. ET AL. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. **Br J Pharmacol**. 169 (3): 477-92, 2013. doi: 10.1111/bph.12159.

SIMONNET, A. *et al.* High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. **Obesity**, v. 28 (2), p. 1195-1199, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/oby.22831>.

SIPRIANI, T. S.; SANTOS, R. A. S; RIGATTO K. The Renin-Angiotensin System: Alamandine is reduced in patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **J Cardiol Cardiovasc Med**. 4: 210-215, 2019. doi: 10.29328/journal.jccm.1001070.

SOLTANI, H. A., JAVANMARDI, K. Alamandine: Potential Protective Effects in SARS-CoV-2 Patients. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. 2021: 6824259, 2021. doi: 10.1155/2021/6824259.

SPARKS, M. A. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, COVID-19, and the Renin-Angiotensin System. **Hypertension**, v. 76 (5): p. 1350–1367, 2020. doi:10.1161/hypertensionaha.120.15948.

SUDHAKAR, M. *et al.* Mechanisms contributing to adverse outcomes of COVID-19 in obesity. **Mol Cell Biochem**. 477 (4): 1155-1193, 2022. doi: 10.1007/s11010-022-04356-w.

SUZUKI S., et al. Structural insight into the activation mechanism of MrgD with heterotrimeric Gi-protein revealed by cryo-EM. **Commun Biol**, 5 (1): 707, 2022. doi: 10.1038/s42003-022-03668-3. PMID: 35840655; PMCID: PMC9287403.

TAMARA, A.; TAHAPARY, D. L. Obesity as a predictor for a poor prognosis of COVID-19: A systematic review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, 4, p. 655-659, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.05.020>.

TAZERJI, J. J. *et al.* Global data analysis and risk factors associated with morbidity and mortality of COVID-19. **Gene Reports**, v. 26, p. 101505, 2452-0144, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101505>.

TING, R.; DUTTON, H.; SORISKY, A. In vitro studies of the renin-angiotensin system in human adipose tissue/adipocytes and possible relationship to SARS-CoV-2: a scoping review. **Adipocyte**. 12 (1): 2194034, 2023. doi: 10.1080/21623945.2023.2194034.

TONG, L. *et al.* Association between body-mass index, patient characteristics, and obesity-related comorbidities among COVID-19 patients: A prospective cohort study. **Obes Res Clin Pract**. 17 (1): 47-57, 2023. doi: 10.1016/j.orcp.2022.12.003.

VANDERBEKE, L. *et al.* Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. **Nat Commun**, v. 12, n. 4117, 2021. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24360-w>.

VASHEGHANI, M. *et al.* Evaluating Possible Mechanisms Linking Obesity to COVID-19: a Narrative Review. **OBES SURG**, v. 32, p. 1689–1700, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s11695-022-05933-0>.

VILLELA, D. C, PASSOS S. D. G, SANTOS, R. A. Alamandine: a new member of the angiotensin family. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 23 (2): 130-4, 2014. doi: 10.1097/01.mnh.0000441052.44406.92.

VINCI, R. *et al.* From angiotensin-converting enzyme 2 disruption to thromboinflammatory microvascular disease: A paradigm drawn from COVID-19. **Int J Cardiol**, v. 1; 326: p. 243-247, 2021. doi: 10.1016/j.ijcard.2020.11.016.

ZHANG, J. *et al.* Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 64, p. 90–107, 2023. doi: <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08921-5>.

ZHU, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, v. 382 (8): p. 727-733, 2020. doi:10.1056/NEJMoa2001017.

ZOHN, I. E. *et al.* Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. **Mol Cell Biol**, 18 (3):1225-35, 1998. doi: 10.1128/MCB.18.3.1225.

WAGENER, G. *et al.* A randomized, placebo-controlled, double-blinded pilot study of angiotensin 1-7 (TXA-127) for the treatment of severe COVID-19. **Crit Care**. 26 (1): 229, 2022. doi: 10.1186/s13054-022-04096-9.

WANG, H. *et al.* Estimating excess mortality due to the COVID-19 pandemic: a systematic analysis of COVID-19-related mortality, 2020–21. **The Lancet**, v. 399, p. 1513-1536, 10334, 2022. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02796-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02796-3).

WANG, J. *et al.* Superspreading and heterogeneity in transmission of SARS, MERS, and COVID-19: A systematic review. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 5039–5046, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2023.100670>.

WANG, W. *et al.* Alamandine/MrgD axis prevents TGF- β 1-mediated fibroblast activation via regulation of aerobic glycolysis and mitophagy. **J Transl Med**. 21, 24, 2023. doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03837-2>.

WEI, Y. *et al.* Comprehensive estimation for the length and dispersion of COVID-19 incubation period: a systematic review and meta-analysis. **Infection**, v. 50, p. 803–813, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01682-x>.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 2020. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 Epidemiological Update**. Edição 160, p. 1-25, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>. Acesso em: 23 nov. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 vaccine tracker and landscape**. R & D Blue Print. Março 30, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. Acesso em: 22 abr. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO-Convened Global Study of Origins of SARS-CoV-2: China Part**. Joint WHO-China Study, p. 120, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>. Acesso em: 22 mar. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 23 nov. 2023.

WU, D. *et al.* The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44-18, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>.

YEC, C. *et al.* Risk Factors for Severe COVID-19 Outcomes Among Persons Aged ≥ 18 Years Who Completed a Primary COVID-19 Vaccination Series — 465 Health Care Facilities, United States, December 2020–October 2021. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 71 (1): p. 19–25, 2022. doi: 10.15585/mmwr.mm7101a4.

YOO, S. H. *et al.* A review of clinical efficacy data supporting emergency use authorization for COVID-19 therapeutics and lessons for future pandemics. **Clin Transl Sci**. 15 (10): 2279 - 2292, 2022. doi: 10.1111/cts.13384.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: “Avaliação da Expressão Gênica dos Componentes do Sistema Renina Angiotensina, do Sistema Caliceína-Cininas e da Resposta Inflamatória no Epitélio Nasal e Sangue Periférico de Indivíduos Eutróficos e Obesos Infectados pelo Sars-Cov-2 no Município de Diamantina.”, em virtude de serem maiores de 18 anos e não apresentarem doenças prévias que impossibilitem a participação no estudo. A pesquisa é coordenada pelo professor Dr Daniel Campos Villela e conta com a colaboração da professora Dr^a Etel Rocha Vieira e do discente de mestrado Jonathan Lopes Moreira.

A sua participação não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, você poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo para sua relação com o pesquisador, com a UFVJM ou com Laboratório de doenças infecciosas e parasitárias.

Os objetivos desta pesquisa são analisar e comparar a quantidade de fatores no epitélio nasal (no nariz) e no sangue que são naturais do organismo humano e podem possuir relação com a COVID-19 entre indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2 e não-infectados pelo vírus SARS-CoV-2, sendo esses com obesidade e eutróficos. Caso você decida aceitar o convite, será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimento: 1. Preenchimento de um formulário que ocorrerá por meio dos pesquisadores, os quais farão perguntas sobre seu nome, endereço, telefone, sexo, idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), nível de atividade física, raça e medicamentos em uso, além de outras informações relevantes ou que impossibilitem a sua participação na pesquisa, como auto relato de presença de doenças agudas ou crônicas. 2. Coleta por swab (coletor) nasal que ocorrerá com inicial explicação do procedimento. Em seguida a sua cabeça será inclinada e introduzido um swab no nariz. Então, será esfregado o coletor com movimentos circulares delicados nas duas narinas em sequência, posteriormente o swab será removido e cuidadosamente introduzido em um tubo com solução fisiológica. 3. Coleta de sangue que ocorrerá com inicial explicação do procedimento para que você entenda o procedimento. Seus braços serão examinados, selecionado o melhor braço e então posicionado um elástico no braço escolhido, que não ultrapassará a 1 minuto, em seguida aplicado o antisséptico no local selecionado e será feita a retirada do sangue. Todas as amostras biológicas serão coletadas por técnico capacitado para intervir em qualquer intercorrência durante a sua coleta e ocorrerá com materiais estéreis. O tempo previsto para a sua participação é de aproximadamente 40 minutos. Os dias e horários para a realização desses procedimentos serão previamente agendados de acordo com sua disponibilidade.

Os riscos relacionados com sua participação são: 1. Risco de sua identificação. Para evitar este risco suas amostras biológicas e o formulário serão nomeados com códigos, o que também garante a análise sigilosa do material. O seu resultado não será apresentado de forma isolado mas em conjunto com os outros voluntários, não permitindo a sua identificação individual. Apenas os pesquisadores do estudo poderão ter contato com suas amostras biológicas ou seu formulário. Os pesquisadores se comprometem a resguardar a confidencialidade, sigilo e privacidade dos seus dados. 2. Você pode sentir sensação de desconforto, irritação, dor e sangramento nasal ao realizar esfregaço nasal. Para minimizar os riscos de sensação de desconforto, irritação e dor a coleta será realizada por técnico capacitado que irá explicar para você detalhadamente como será feito o procedimento. Para minimizar o risco de sangramento nasal seu nariz será avaliado inicialmente, em busca de alterações estruturais que aumentem o risco de sangramento. Ademais, o correto

posicionamento do técnico e seu, minimizarão os riscos citados acima. O técnico responsável pela coleta estará capacitado para intervir em qualquer intercorrência durante esta coleta. 3. Devido a coleta de sangue, você poderá desenvolver hematoma no local da punção, poderá também sentir dor à punção ou ficar tonto(a) durante a coleta. Para minimizar os riscos de dor e desenvolvimento de hematoma a coleta de sangue será realizada por por técnico capacitado e experiente em coleta de sangue (flebotomia). Para minimizar o risco de tontura, será perguntado se em algum momento você desmaiou em situações de coleta de sangue, e se a resposta for “sim” você não será considerado(a) para o estudo. O técnico estará capacitado para intervir em qualquer intercorrência durante a está coleta.

Você não será diretamente beneficiado(a) com este estudo. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em seminários, congressos e similares, entretanto, os dados/informações pessoais obtidos por meio da sua participação serão confidenciais e sigilosos, não possibilitando sua identificação.

Não há remuneração com sua participação, bem como a de todas as partes envolvidas. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se você sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização. Os pesquisadores não têm previsão de pagar por eventuais despesas para a sua participação na pesquisa.

Qualquer dúvida que possa surgir durante o andamento do estudo poderá ser esclarecida pessoalmente ou pelo contato telefônico das pesquisadoras Daniel Campos Villela (38) 99731-1701 ou Jonathan Lopes Moreira (38) 99745-9961, ou pelos e-mails: daniel.villela@ufvjm.edu.br e lopes.moreira@ufvjm.edu.br. Você poderá também entrar em contato com o comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM no Campus JK pelo telefone: (38) 3532-1240 ou pelo e-mail cep@ufvjm.edu.br para informações sobre a aprovação do projeto pelo comitê.

Declaro que entendi os objetivos, a forma de minha participação, riscos e benefícios da mesma e aceito o convite para participar. Autorizo a publicação dos resultados da pesquisa, a qual garante o anonimato e o sigilo referente à minha participação.

Nome do participante da pesquisa: _____

Assinatura do participante da pesquisa: _____

formações – Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM
Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba
Diamantina/MG CEP: 39.100-000
Tel.: (38) 3532-1240
Coordenador: Prof. Fábio Luiz Mendonça Martins
Secretária: Leila Adriana Gaudencio Sousa
Email: cep.secretaria@ufvjm.edu.br