

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

JULIA HUPPES MAJOLO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL EM CÉLULAS
VERO INFECTADAS COM SARS-CoV-2**

Porto Alegre
2024

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL EM CÉLULAS
VERO INFECTADAS COM SARS-CoV-2**

Julia Hupples Majolo

TESE DE DOUTORADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - 90619-900
Porto Alegre, RS, Brasil
2024

Ficha Catalográfica

M234a Majolo, Julia Huppes

Avaliação dos efeitos de losartan e maleato de enalapril em células VERO infectadas com SARS-CoV-2 / Julia Huppes Majolo.

– 2024.

46 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

1. Coronavírus. 2. COVID-19. 3. Hipertensão. I. Ferreira, Carlos Alexandre Sanchez. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL EM CÉLULAS
VERO INFECTADAS COM SARS-CoV-2**

Aluna: Julia Huppes Majolo

Orientador: Dr. Carlos

Alexandre Sanchez Ferreira

**Tese apresentada como requisito para
obtenção do grau de doutor pelo Programa
de Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular da Escola de Ciências da Saúde e
da Vida da Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul.**

TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

2024

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

TÍTULO:

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL EM CÉLULAS
VERO INFECTADAS COM SARS-CoV-2**

Aluna: Julia Hupples Majolo

**Orientador: Dr. Carlos Alexandre
Sanchez Ferreira**

Aprovada em: 30 de abril de 2024 .

Banca examinadora:

Daniel Simon

Ivan Carlos Ferreira Antonello

Renata Medina da Silva

PORTO ALEGRE, RS, Brasil

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, especialmente à Escola de Ciências da Saúde e da Vida, pois foi nesta instituição que completei minha graduação em Ciências Biológicas em 2019, e nela continuo meu percurso acadêmico até hoje.

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia, que possibilitou a realização deste projeto e que me acolheu durante a minha caminhada. Especialmente as laboratoristas, Vanessa e Maila, que sempre auxiliaram nas técnicas e andamento do laboratório. E também aos meus colegas de laboratório, essenciais para minha evolução durante o doutorado.

Ao Professor Doutor Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, meu orientador, pela paciência, atenção e pela manifestação de apoio imprescindível durante este período. Também pela compreensão e aconselhamentos que contribuíram com o aprofundamento do trabalho.

Agradeço também, à minha família, em particular aos meus pais, que me apoiaram em toda minha jornada acadêmica, sem eles esta caminhada não seria possível. Agradeço minha irmã Jordana e ao meu sobrinho José, por momentos de descontração e apoio. Agradeço em especial minha tia Vânia e minha prima Larissa, com as quais sempre pude contar nesse período. Por fim, agradeço aos meus amigos mais próximos, que nunca me deixaram desistir ou perder o amor pela ciência, obrigada Renata e Amanda.

Lista de Siglas

(+) ssRNA	RNA de fita simples e de sentido positivo
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang 1-9	Angiotensina 1-9
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	adenosina trifosfato
AT1R	Receptor de angiotensina I
AT2R	Receptor de angiotensina II
Bat CoV	Coronavírus de morcego
BRA	Bloqueador dos receptores da angiotensina
CDKs	Quinases dependentes de ciclina
CDKN1A	Quinase dependente de ciclina 1
CoVs	Coronavírus
COVID-19	Doença do Corona Vírus 2019
CP	Domínio citoplasmático
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMVs	Vesículas de Dupla Membrana
E	Envelope
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina II
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HCoVs	Coronavírus Humanos
iECA	Inibidores da ECA
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina-6
IL-18	Interleucina-18
IP-10	Proteína 10

M	Membrana
MCP1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS-CoV	Síndrome Respiratória Coronavírus do Oriente Médio
MHC classe II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
mRNA	RNA mensageiro
N	Nucleocapsídeo
Nsp	non structural proteins
NTD	Domínio N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Open Reading Frames
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
Pró-IL-1 β	Pró-interleucina-1-beta
Pró-IL-18	Pró-interleucina-18
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RCHY1	CHY zinc finger domain-containing 1
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RE	Retículo Endoplasmático
S	proteína de espícula ou Spike
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
sgRNA	RNA subgenômico
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SQSTM1	Sequestrossoma 1
TM	domínio transmembrana
TMPRSS2	Serina Protease Transmembrana 2
VBI	vírus da bronquite infecciosa
VOC	Variantes de Preocupação
VOI	Variantes de Interesse
vRNA	RNA viral

Sumário

Resumo	9
Abstract	10
1. Introdução	11
1.1 Coronavírus.....	11
1.2 Transmissão e Tratamentos	13
1.3 Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2.....	14
1.4 Ciclo Viral	15
1.5 Mecanismos Celulares Ativados pela Infecção Viral	16
1.6 Morte Celular, Ciclo Celular e Coronavírus.....	17
1.7 Variantes de SARS-CoV-2	20
1.8 Vacinas	21
1.9 Hipertensão e COVID-19	22
1.10 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	23
2. Justificativa	26
3. Objetivos	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. Capítulo 1	28
4.1 Artigo Científico Publicado	28
5. Considerações Finais e Perspectivas	39
6. Referências	40

Resumo

Desde seu surgimento, a pandemia de COVID-19 tem ocasionado desafios significativos para os sistemas de saúde globais, impactando particularmente indivíduos com condições pré-existentes, como a hipertensão. Por essa razão, a segurança e a influência do uso de anti-hipertensivos no decorrer da doença foram questionadas pela comunidade científica. Neste estudo, investigamos se o tratamento com os anti-hipertensivos, losartan ou maleato de enalapril, respectivamente um antagonista dos receptores de angiotensina (BRA) e um inibidor da ECA (iECA), em células permissivas ao vírus da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) tem algum efeito na replicação do vírus, morte celular e na expressão de biomarcadores. Os resultados revelaram que o losartan reduziu substancialmente os níveis de RNA do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 para níveis quase indetectáveis, enquanto o maleato de enalapril não demonstrou um efeito significativo. Em resposta à infecção viral, a expressão de IL-18, p53, p21 e p62 aumentou em comparação com células não tratadas e não infectadas. Notavelmente, a expressão de IL-6 foi aumentada tanto pela infecção quanto pelos tratamentos. Uma comparação entre células infectadas tratadas com losartan ou maleato de enalapril destacou a presença de perfis distintos na expressão de IL-6, p53, p21 e p62. Assim, há indícios que esses compostos, iECA/ARB, modulam de forma distinta as células renais diante da infecção por SARS-CoV-2 e esta influência parece variar tanto quantitativa quanto qualitativamente na modulação de vias metabólicas e de transdução de sinal. Entretanto, ainda é essencial realizar mais pesquisas para entender o impacto dos medicamentos anti-hipertensivos na progressão da COVID-19 em diferentes tipos celulares, para elucidar como os mecanismos influenciados por esses medicamentos afetam os desfechos dos pacientes.

Palavras-chave: iECA; BRA; coronavírus; COVID-19, hipertensão

Abstract

Since its emergence, the COVID-19 pandemic has led to significant challenges to global healthcare systems, particularly impacting individuals with pre-existing conditions, such as hypertension. For this reason, the safety and influence of antihypertensive treatments during the course of the disease have been questioned by the scientific community. In this study, we investigated whether treatment with the antihypertensive drugs losartan or enalapril maleate, respectively an angiotensin receptor blocker (ARB) and an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi), in cells permissive to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has any effect on virus replication, cell death, and biomarkers expression. The results revealed that losartan substantially reduced the levels of SARS-CoV-2 nucleocapsid RNA to nearly undetectable levels, while enalapril maleate did not demonstrate a significant effect. In response to the viral infection, the expression of IL-18, p53, p21, and p62 increased compared to untreated and uninfected cells. Notably, IL-6 expression was increased by both infection and treatments. A comparison between infected cells treated with losartan or enalapril maleate highlighted the presence of distinct profiles in the expression of IL-6, p53, p21, and p62. Therefore, there is evidence that these compounds, ACEi/ARB, modulate renal cells differently in face of SARS-CoV-2 infection, and this influence appears to alter both quantitatively and qualitatively in the modulation of metabolic and signal transduction pathways. However, it is still essential to conduct further research to understand the impact of antihypertensive medications on the progression of COVID-19 in different cell types, to elucidate how the mechanisms influenced by these medications affect patient outcomes.

Keywords: ACEi; ARB; coronaviruses; COVID-19; hypertension

1. Introdução

1.1. Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) são uma família de vírus conhecidos por infectar mamíferos e aves, incluindo animais de criação e de estimação. Em 1931, o primeiro representante dos CoVs foi descoberto, o vírus da bronquite infecciosa (VBI), causador de doenças respiratórias em aves (SCHALK; HAWN, 1931). Os membros da família *Coronaviridae* possuem como característica principal o genoma de RNA de fita simples e de sentido positivo [(+) ssRNA], sendo geneticamente categorizados nos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (GORBALENYA et al., 2020). Sete CoVs já foram descritos por infectarem humanos, designados como HCoVs (coronavírus humanos). Dois deles, HCoV-229E e HCoV-NL63 pertencem ao gênero *Alphacoronavirus*. Já HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 pertencem ao gênero *Betacoronavirus*, que também abrange os HCoVs de maior interesse à saúde pública, como o Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus (SARS-CoV-1), Síndrome Respiratória Coronavírus do Oriente Médio (MERS-CoV) e Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2 (SARS-CoV-2)(CUI; LI; SHI, 2019; GORBALENYA et al., 2020; HUI et al., 2021).

Os HCoVs podem causar uma variedade de sintomas em pessoas infectadas, que podem variar de leves a graves, ou mesmo se apresentar de forma assintomática. Alguns dos sintomas mais comuns incluem febre, tosse seca, falta de ar ou dificuldade para respirar, fadiga, dores musculares e corporais, dor de garganta, congestão nasal, perda do olfato e/ou paladar, e sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia (HU et al., 2021). Além disso, complicações mais graves, como pneumonia e insuficiência respiratória, podem ocorrer em casos mais avançados da doença, levando a altas taxas de mortalidade e alertas à saúde pública.

O SARS-CoV-1 provocou um surto de transmissão levando a epidemias da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), que iniciou em 2002, na província de Guangdong, na China, e rapidamente se espalhou para outras regiões e países (SU et al., 2016). Foram confirmados cerca de 8.000 casos e aproximadamente 774 mortes da doença em todo o mundo. Após o controle da epidemia em 2003, não houve novos relatados de casos do SARS-CoV-1 em humanos (HUI et al., 2021).

Já a emergência causada pelo MERS-CoV, resultou em mais de 2.500 casos da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) desde sua primeira identificação em 2012. Os casos foram principalmente relatados no Oriente Médio e estão associados a lesões pulmonares graves induzidas pelo vírus e uma alta taxa de letalidade, chegando a 36%. O MERS-CoV originou-se de morcegos e encontrou um reservatório animal em camelos e dromedários (AZHAR et al., 2019; SU et al., 2016).

No final de dezembro de 2019, um novo coronavírus foi descoberto, o SARS-CoV-2, causador da COVID-19 (*Corona Virus Disease 2019*), se tornando a maior pandemia causada por um HCoV. Os primeiros infectados pelo SARS-CoV-2 foram relatados em Wuhan, Província de Hubei, na China, onde pacientes internados com diagnóstico inicial de pneumonia, porém sem um diagnóstico definido, levaram a pesquisa da causa etiológica da doença, posteriormente esses pacientes foram epidemiologicamente vinculados a um mercado atacadista de frutos do mar e animais silvestres (BOGOCH et al., 2020).

A similaridade genética extremamente alta (>96%) entre o SARS-CoV-2 e um coronavírus de morcego (Bat CoV RaTG13) indica que o SARS-CoV-2 pode ter origem em morcegos (GUO et al., 2020; ZHOU et al., 2020a). Entretanto, coronavírus relacionados ao SARS-CoV-2 foram detectados em pangolins no Sudeste Asiático, podendo assim serem considerados reservatórios naturais potenciais do SARS-CoV-2 (ZHAO; CUI; TIAN, 2020). Sabe-se pela comparação da sequência genética que ambos SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 estão no subgênero *Sarbecovirus* e compartilham uma similaridade genética de cerca de 79% e ainda compartilham o mesmo receptor nas células do hospedeiro, a enzima conversora da angiotensina II (ECA2) (GOYAL et al., 2022; KUNG et al., 2022).

Em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o surto de coronavírus uma emergência de saúde pública de importância internacional e, em março do mesmo ano, declarou a situação uma pandemia, à medida que o vírus se disseminava por todo o mundo, sendo o fim do estado de pandemia declarado apenas em maio de 2023. Medidas para diminuir a dispersão foram tomadas neste período como *lockdowns*, uso de máscara de proteção facial, distância social e uso de álcool em gel, mas mesmo assim até fevereiro de 2024, segundo a OMS (Coronavirus (COVID-19) Dashboard, World Health Organization), foram confirmadas mais de 750 milhões de

casos de COVID-19 e mais de 7 milhões de mortes mundialmente. Os Estados Unidos da América foi o país com maior número de mortes até o momento, cerca de 1,2 milhões, seguidos pelo Brasil, com mais de 37 milhões de casos e mais de 700 mil mortes, e em terceiro lugar a Índia, com mais de 530 mil mortes.

1.2. Transmissão e Tratamentos

A transmissão do vírus ocorre principalmente a partir de uma pessoa infectada diretamente para outra, por gotículas respiratórias oriundas de tosse, espirro ou fala. Também pode ser transmitido por contato próximo com pessoas infectadas ou por superfícies contaminadas (LI et al., 2020). Os sintomas da infecção pelo SARS-CoV-2 surgem após um período de incubação, o qual pode variar entre 2 a 14 dias. Os sintomas iniciais mais comuns incluem febre, tosse e fadiga, mas também pode ocorrer produção de muco, dor de cabeça, diarreia, dificuldade respiratória e redução no número de linfócitos. Fatores genéticos e comorbidades pré-existentes desempenham um papel significativo na suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2 e no desenvolvimento de formas graves da doença (REN et al., 2020; ROTHAN; BYRAREDDY, 2020).

Os tratamentos para COVID-19 variam dependendo da gravidade dos sintomas e das condições do paciente. Em casos leves são prescritos remédios para alívio dos sintomas, como analgésicos e anti-inflamatórios. Já quando há dificuldade respiratória, o oxigênio suplementar pode ser administrado para garantir que o corpo receba oxigênio suficiente. Em casos graves os corticosteroides também são utilizados, como a dexametasona, para reduzir a inflamação nos pulmões dos pacientes hospitalizados. Com a progressão da doença, há um aumento no risco de formação de coágulos sanguíneos, por isso, anticoagulantes podem ser prescritos para ajudar a prevenir essa complicação. Outras estratégias apresentam maior ênfase em agentes antivirais, tais como os inibidores da atividade de RNA polimerases Remdesivir e o Favipiravir. A combinação de molnupiravir com ritonavir, o Paxlovid, um inibidor de protease, também é utilizado. Esses medicamentos, no geral, mostraram um menor tempo de internação de pacientes em estados graves (LUI; GUARALDI; LUI, 2023; YUAN et al., 2023). Terapias com alguns anticorpos monoclonais, como o casirivimabe/imdevimabe e o sotrovimabe, foram autorizados para uso emergencial no tratamento de casos leves a moderados de COVID-19 em pacientes de alto risco (YUAN et al., 2023). Muitos

estudos desde o início da pandemia vêm sendo testados, mas nenhuma terapia direta e funcional contra a infecção e os sintomas causados por ela foram confirmados até o momento.

1.3. Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2

As principais estruturas que compõem SARS-CoV-2 são o envelope (E), a membrana (M), o nucleocapsídeo (N), o genoma de RNA positivo e a proteína de espícula ou *Spike* (S), que forma uma estrutura de coroa envolta do vírus, dando sua nomeação de “corona”. Entre as estruturas virais, a proteína S (Figura 1), a sua ativação e a entrada do vírion na célula hospedeira são fundamentais para compreender a fisiopatologia da infecção por coronavírus. A proteína S possui uma estrutura tridimensional composta por diversos domínios, tais como o domínio N-terminal (NTD), o domínio de ligação ao receptor (RBD), o domínio transmembrana (TM) e o domínio citoplasmático (CP). Além disso, a proteína também contém sítios de clivagem proteolítica, como os sítios de clivagem S1/S2 e S2', os quais são cruciais para sua ativação (TAY et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

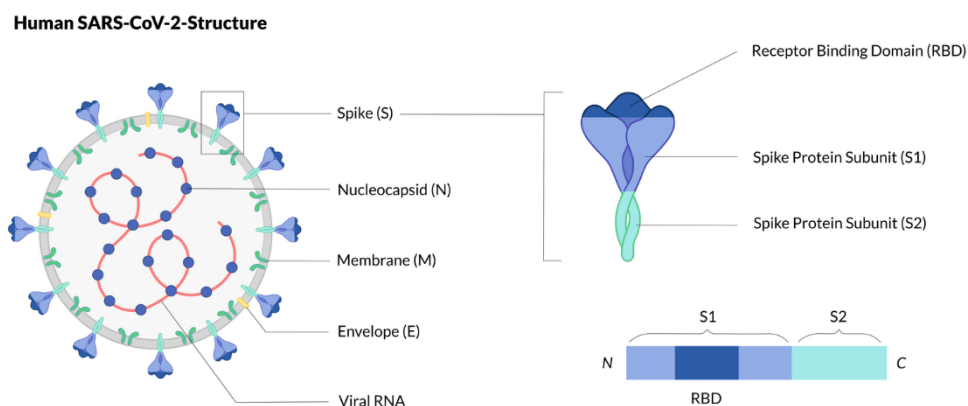


Figura 1. Estrutura SARS-CoV-2.

Fonte: <https://www.lubio.ch/applications/coronavirus-research/viral-proteins>

O genoma do SARS-CoV-2 contém 14 módulos de leitura abertos (ORFs, de *Open Reading Frames*), que são divididos em duas partes, e codificam várias proteínas, incluindo proteínas estruturais, proteínas não estruturais e proteínas acessórias. Resumidamente, os ORF1a e ORF1ab são diretamente traduzidos em duas poliproteínas (pp1a e pp1ab) pelos ribossomos celulares, que posteriormente são clivadas em

dezesesseis proteínas não estruturais (nsps, de *non structural proteins*), as quais possuem papéis essenciais na replicação viral, modulação da resposta imune do hospedeiro e na montagem de partículas virais (BRANT et al., 2021). As nsps presentes na unidade replicativa do SARS-CoV-2 incluem nsp1, nsp2, nsp3, nsp4, nsp5 (também conhecida como 3CLpro ou Mpro), nsp12 (RNA polimerase), nsp13 (helicase), nsp14 (exoribonuclease/n7-metiltransferase), nsp15 (endoribonuclease) e nsp16 (2'-O-metiltransferase), entre outras (GUSEV et al., 2022). Essas proteínas interagem de maneira coordenada para formar o complexo replicativo do vírus, que é responsável pela replicação e transcrição do RNA viral. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) é necessária para a expressão do restante do genoma. Notavelmente, a replicação do genoma viral também é mediada pela RdRp. RNAs subgenômicos (sgRNA) utilizam os sistemas de transcrição e tradução do hospedeiro para sintetizar as proteínas estruturais e várias proteínas acessórias (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c e ORF10) (YAN et al., 2022).

1.4. Ciclo viral

O SARS-CoV-2 pode infectar a célula hospedeira por duas vias principais, através da ativação de fusão na superfície celular ou pela endocitose do vírion. Para o processo de ativação da fusão, a subunidade S1 da proteína S viral se liga ao receptor ECA2 na superfície da célula hospedeira. Após a ligação inicial, a proteína S sofre uma mudança conformacional, expondo uma região conhecida como domínio de fusão, a S2, permitindo a interação com a membrana celular da célula hospedeira. A subunidade S2 então é clivada em uma região adicional interna, denominada 'sítio S2', pela TMPRSS2 presente na superfície celular, uma proteína transmembranar do tipo II com atividade de serina protease, para assim, ativar completamente o processo de fusão viral (HOFFMANN et al., 2020). Já pelo processo de endocitose, após a ligação da proteína S a ECA2, o vírion é endocitado e ocorre a clivagem do sítio S1/S2 pela catepsina L endolisossomal, que medeia a fusão entre a membrana do vírus nos compartimentos endossômicos, sendo que esta etapa necessita um meio com pH ácido para realizar a fusão (ZHAO et al., 2021).

Após o processo inicial da infecção, o RNA viral (vRNA) é liberado no citoplasma celular, onde ocorre a tradução e a replicação do genoma. O SARS-CoV-2 apresenta um

genoma de RNA de fita simples de sentido positivo [(+) ssRNA], possui um cap 5' e uma cauda de poli(A) 3' e, portanto, funciona como RNA mensageiro (mRNA) pronto para tradução. Assim, o genoma de cadeia positiva de entrada serve como um modelo para RNA de cadeia negativa de comprimento total e sgRNA. Como citado anteriormente, o processo é iniciado pela síntese das proteínas replicativas, através da tradução dos módulos abertos de leitura, ORF1a e ORF1b, resultando na produção de duas poliproteínas precursoras (PP1a e PP1b). O processamento de PP1a e PP1b resulta em diversas nsps, com diferentes funções, como por exemplo, nsp3, nsp4 e nsp6, que desempenham papéis cruciais na montagem do complexo replicativo associado à membrana responsável pela transcrição e replicação do genoma viral (YAN et al., 2022).

Essas proteínas contêm domínios transmembrana que mediam o recrutamento do complexo para vesículas originadas do retículo endoplasmático (RE), protegendo os genomas virais da vigilância imunológica inata da célula hospedeira. A replicação ocorre então em vesículas de dupla membrana (DMVs) induzidas pelo vírus e derivadas do retículo endoplasmático (RE), que eventualmente se integram para formar elaboradas redes de membranas (V'KOVSKI et al., 2021). A tradução do sgRNA resulta em proteínas estruturais e acessórias que são inseridas no compartimento intermediário do RE para montagem dos vírions. Finalmente, genomas de RNA de sentido positivo subsequentes são incorporados em vírions recém-sintetizados, que são secretados da MP, e então os novos vírions podem infectar células adjacentes e continuar o ciclo de infecção (TAY et al., 2020; V'KOVSKI et al., 2021).

1.5. Mecanismos Celulares Ativados pela Infecção Viral

Quando a replicação viral ocorre ativamente nas células, há uma consequentemente maior liberação de vírions, culminando com a destruição de células pulmonares majoritariamente pelo processo de piroptose, a qual se caracteriza como uma forma de morte celular necrótica programada, sendo uma estratégia chave de defesa do hospedeiro contra patógenos (FINK; COOKSON, 2005a). Entretanto, quando este tipo de morte celular ocorre de forma excessiva, há uma alta liberação de citocinas pró-inflamatórias, assim como a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo RNA viral, adenosina trifosfato (ATP), ácidos nucleicos e oligômeros ASC. Esses padrões são

reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos alveolares, desencadeando uma resposta a infecção e também a secreção de mais citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas como, a interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN γ), proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP1), fator de necrose tumoral (TNF) e proteína 10 (IP-10). Consequentemente, monócitos, macrófagos e linfócitos T são atraídos para o local da infecção, promovendo uma maior inflamação (com a adição de IFN γ produzido por linfócitos T) e estabelecendo um ciclo de *feedback* pró-inflamatório (TAY et al., 2020).

Quando há uma resposta imune saudável, linfócitos T específicos para o vírus são atraídos para o local da infecção, onde podem eliminar as células infectadas antes que o vírus se espalhe. Anticorpos neutralizantes nessas pessoas podem bloquear a infecção viral, e os macrófagos alveolares reconhecem vírus neutralizados e células apoptóticas e os eliminam por fagocitose. No geral, esses processos levam à eliminação do vírus e a danos mínimos nos pulmões, resultando na recuperação dos pacientes. Em alguns casos, a resposta imune pode não ser adequada, causando um acúmulo de células imunes nos pulmões, causando superprodução de citocinas pró-inflamatórias, gerando a tempestade de citocinas, que eventualmente danificam a infraestrutura pulmonar. A elevada concentração de citocinas e quimiocinas inflamatórias amplifica o dano tecidual através da disfunção endotelial e vasodilatação, o que permite a migração de células imunes, como macrófagos e neutrófilos para o local afetado. Assim há um aumento da permeabilidade vascular e comprometimento da função de barreira, promovendo a inflamação dos vasos sanguíneos e edema pulmonar, o que limita a troca gasosa e leva à hipoxia, causando insuficiência respiratória ou sistêmica. As células endoteliais, por sua vez, aumentam a expressão de moléculas de adesão leucocitária, facilitando o acúmulo de células imunes que contribuem para a progressão da insuficiência respiratória (TAY et al., 2020).

1.6. Morte Celular, Ciclo Celular e Coronavírus

Os vírus em geral, incluindo os coronavírus, possuem estratégias para manipular as vias celulares hospedeiras para facilitar sua replicação e evadir a resposta imunológica do hospedeiro. Entre estas estratégias, estão os processos de morte celular, incluindo

apoptose, piroptose e autofagia, além da própria regulação do ciclo celular (FINK; COOKSON, 2005b).

A apoptose é um processo programado de morte celular que ocorre como parte da resposta imunológica normal do hospedeiro. Durante uma infecção por coronavírus, a apoptose pode ser desencadeada como parte da resposta antiviral do hospedeiro para limitar a replicação viral e eliminar as células infectadas (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021).

Já na morte celular por piroptose, ocorre a rápida ruptura da membrana plasmática e liberação de conteúdo intracelular pró-inflamatório para o exterior das células, mecanismo distinto do que ocorre na apoptose (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021). Este tipo de morte celular ocorre através da ativação do inflamassoma, que é composto por diferentes proteínas, e quando ativado libera uma cascata de sinalização que leva à ativação da Caspase 1, que por sua vez catalisa a conversão de pró-interleucina-1 β (pró-IL-1 β) e pró-interleucina-18 (pró-IL-18) em interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18), respectivamente (20). Quando liberadas, essas citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro contra patógenos, na regulação da resposta imune e na promoção da cicatrização de tecidos danificados (DIARIMALALA et al., 2023).

A morte celular por autofagia é caracterizada como um processo em que componentes celulares, como macroproteínas ou mesmo organelas inteiras, são captados e direcionados aos lisossomos para degradação. A autofagia está relacionada ao sequestrassoma 1 (SQSTM1), também conhecida como p62, que atua como um receptor autofágico, desempenhando um papel crucial no direcionamento de estruturas para degradação dentro de autofagossomos (MOSCAT; DIAZ-MECO, 2009).

A autofagia pode ser iniciada como uma resposta à privação de nutrientes, por exemplo, e em respostas do sistema imunológico adaptativo e inato, através da degradação de patógenos intracelulares e entrega de antígenos aos compartimentos do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC classe II) (LEVINE; DERETIC, 2007).

Em células infectadas pelo SARS-CoV-2, foi observado que o vírus pode modular a via de autofagia de várias maneiras. Por exemplo, o vírus pode interferir na regulação da autofagia para promover sua replicação e sobrevivência dentro das células hospedeiras. Além disso, evidências sugerem que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode aumentar a expressão de p62 em algumas linhagens celular (QU et al., 2021; ZAMBALDE et al., 2023), manipulando a autofagia para evitar a resposta imunológica do hospedeiro, promovendo assim sua própria replicação e disseminação (KOČI et al., 2022).

A infecção viral é um processo complexo e dinâmico, capaz de regular a progressão do ciclo celular do hospedeiro em várias fases da infecção com base nos requisitos de replicação (SU et al., 2020). A p53, conhecida como guardiã do genoma e capaz de desempenhar funções importantes em respostas ao estresse celular, atua como um supressor tumoral, impedindo a progressão do ciclo celular em células danificadas e induzindo a reparação do DNA ou a apoptose, se necessário (LEVINE, 1997). Neste contexto, a proteína p53 é amplamente reconhecida como uma molécula-chave para a homeostase celular e regulação imune (Sato & Tsurumi, 2013), exercendo estas funções principalmente como um fator de transcrição, ativando a expressão de genes envolvidos na parada do ciclo celular, na reparação do DNA e na morte celular por apoptose. Sua interação com outras proteínas é de extrema importância, em particular com o inibidor de quinase dependente de ciclina 1 (CDKN1A), também conhecido como p21 que inibe as quinases dependentes de ciclina (CDKs), levando à parada do ciclo celular na fase G1 (KARIMIAN; AHMADI; YOUSEFI, 2016).

Embora as informações detalhadas sobre como o SARS-CoV-2 direciona e manipula a via de p53 ainda sejam limitadas, estudos com outros coronavírus fornecem algumas perspectivas. Evidências de estudos experimentais *in vitro* e em sistemas de modelo celular identificaram que as proteínas nsp3 do SARS-CoV-1, MERV-CoV e NL63-CoV interferem na proteína RING finger e CHY zinc finger domain-containing 1 (RCHY1), uma E3 ubiquitina ligase que promove a degradação do p53 independentemente do Mdm2 (inibidor natural do p53), marcando-a para degradação proteossômica (LODI et al., 2022). Assim, quando a disponibilidade de p53 é reduzida, a sobrevivência celular é aumentada, as respostas imunes podem ser evitadas, e a replicação e disseminação do vírus dentro do hospedeiro são facilitadas (WANG et al., 2023b).

1.7. Variantes

Os vírus podem sofrer mutações genéticas ao longo do seu ciclo celular, essas mutações geram mudanças conformacionais e funcionais nas proteínas virais, surgindo assim novas variantes do SARS-CoV-2. As variantes despertam preocupações devido a possíveis mudanças em sua transmissibilidade, agravamento da doença ou resistência a tratamentos e vacinas, por isso são monitoradas pela OMS, que as classifica em diferentes categorias com base em seu impacto na saúde pública global.

As Variantes de Interesse (VOI) apresentam alterações genéticas significativas, porém não representem uma ameaça iminente à saúde pública global. Alguns exemplos são a Kappa (B.1.617.1), originária da Índia que tem sido associada a surtos significativos de COVID-19 em algumas regiões, e Lambda (C.37), inicialmente identificada no Peru e que tem despertado preocupações devido a mutações que podem afetar a transmissibilidade e a eficácia das vacinas. Outras variantes são a B.1.1.28 (Epsilon) e a B.1.1.33, variante inicialmente identificada no Brasil, a qual tem sido monitorada de perto e já foi relatada em diferentes regiões do país (DEGRACE et al., 2022).

Por outro lado, as Variantes de Preocupação (VOC) estão associadas a mudanças significativas em fatores como transmissibilidade, gravidade da doença, eficácia das vacinas ou diagnósticos. Essas variantes representam uma ameaça mais substancial à saúde pública global e requerem uma resposta mais robusta por parte das autoridades de saúde. Identificada inicialmente no Reino Unido, a variante Alfa (B.1.1.7) é conhecida por ser mais transmissível do que outras cepas do vírus original. A variante Beta (B.1.351), inicialmente detectada na África do Sul e semelhante a variante Alfa, demonstrou uma resistência potencialmente aumentada às vacinas e terapias monoclonais, levantando preocupações sobre sua capacidade de escapar da resposta imunológica induzida pela vacinação ou infecção natural. Uma variante que levantou questões sobre sua transmissibilidade, gravidade da doença e eficácia das vacinas foi a Ômicron (B.1.1.529), que foi primeiro detectada na África do Sul. Outra variante que se originou no Brasil, a variante Gama (P.1), possui possivelmente uma maior transmissibilidade, assim como a Delta (B.1.617.2), originária da Índia (SARKAR; MADABHAVI, 2022).

1.8. Vacinas

Em meio a emergência de um tratamento e/ou imunização para diminuir a propagação e os danos causados pelo vírus, a vacinação para a COVID-19 foi essencial na luta contra o coronavírus. Diferentes vacinas foram desenvolvidas no mundo e com diferentes tecnologias. Cada modelo de vacina tem suas próprias vantagens e considerações e todas passaram por rigorosos testes clínicos para garantir sua eficácia e segurança antes de serem autorizadas para uso em larga escala. Até novembro de 2023, segundo a OMS, cerca de 67% da população mundial se encontra vacinada com uma série primária completa de uma vacina contra o SARS-CoV-2.

Entre as principais vacinas desenvolvidas estão as Pfizer [BioNTech (Comirnaty)] e Moderna (mRNA-1273), ambas utilizando mRNA sintético e modificado para instruir as células do corpo a produzirem a proteína S viral em um contexto imune (HAHN; WILEY, 2022; HUANG; ZENG; YAN, 2021). Já a Oxford-AstraZeneca (AZD1222) e Janssen (Johnson & Johnson) (Ad26.COV2.S) utilizaram um adenovírus não virulento como vetor da vacina. A Sinovac-CoronaVac e Sinopharm (BBIBP-CorV) foram desenvolvidas a partir da inativação do vírus após sua produção em cultura de células, para as estruturas virais, principalmente a proteína S, poderem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. Entre as outras tecnologias empregadas, pode-se citar a empregada na vacina Sanofi-GSK com a utilização de uma proteína S viral recombinante, enquanto que a Covovax (NVX-CoV2373), desenvolvida pela Novavax, foi desenvolvida com nanopartículas proteicas (JIN et al., 2022).

Em dezembro de 2020, a vacinação começou em alguns países, como Reino Unido, Estados Unidos, Canadá e Rússia, após a autorização de uso emergencial de várias vacinas, incluindo a vacina Pfizer-BioNTech e a vacina Moderna. A União Europeia iniciou a vacinação em 27 de dezembro de 2020, utilizando principalmente as vacinas Pfizer-BioNTech e AstraZeneca. Já países como China, Índia e Israel também iniciaram a vacinação em dezembro de 2020 ou janeiro de 2021, utilizando principalmente vacinas desenvolvidas localmente. No Brasil esse processo iniciou em 17 de janeiro de 2021, quando a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) autorizou o uso emergencial das vacinas CoronaVac, desenvolvida pelo laboratório chinês Sinovac em parceria com o Instituto Butantan, e da vacina Covishield, desenvolvida pela Universidade de Oxford

em parceria com a AstraZeneca e produzida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (CHAKRABORTY; BHATTACHARYA; DHAMA, 2023).

É importante ressaltar que em países de baixa renda ou em desenvolvimento, a vacinação começou mais tarde, devido à disponibilidade limitada de vacinas e à dependência de iniciativas como o programa COVAX, que visa garantir o acesso equitativo às vacinas contra a COVID-19 em todo o mundo, mais uma vez demonstrando que a desigualdade social está presente em muitos âmbitos, especialmente na saúde geral da população.

1.9. Hipertensão e COVID-19

A pressão arterial elevada, ou a hipertensão, é uma condição médica comum e crônica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que 1,28 bilhão de adultos com idades entre 30 e 79 anos em todo o mundo tenham hipertensão (SANTOS et al., 2023) e aproximadamente 46% dos adultos com hipertensão não têm consciência de que possuem a condição (ZHOU et al., 2021). Alguns fatores de risco para hipertensão são a obesidade, estilo de vida sedentário, dieta não saudável, tabagismo e consumo excessivo de álcool. No Brasil, a hipertensão arterial é uma condição de saúde pública significativa e uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Dados do Ministério da Saúde de 2021 indicam que aproximadamente 30% da população adulta brasileira é hipertensa e sua prevalência aumenta com a idade, sendo mais comum em adultos mais idosos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A hipertensão é um fator de risco conhecido para várias doenças cardiovasculares, como acidente vascular cerebral, doença cardíaca coronária, insuficiência cardíaca e doença renal crônica (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020). Estes efeitos podem ser evitados ou significativamente reduzidos com o tratamento adequado, porém, segundo a OMS, estima-se que apenas 1 em cada 5 adultos (21%) possuem a doença sob controle no mundo, e menos da metade dos adultos (42%) com hipertensão são diagnosticados.

A hipertensão também pode afetar prejudicialmente a função do sistema imunológico, tornando os pacientes mais suscetíveis a infecções no geral e está associada a um estado inflamatório crônico de baixo grau no corpo (MADHUR et al.,

2021). Essa inflamação sistêmica pode amplificar a resposta inflamatória desencadeada pela infecção por coronavírus, levando a complicações e exacerbar a resposta inflamatória, podendo danificar os tecidos e órgãos, como o coração, os rins e os pulmões. Estas condições podem predispor os pacientes a complicações graves comuns relacionadas a COVID-19, tais como insuficiência cardíaca, insuficiência renal e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MADHUR et al., 2021; MILLS KT; STEFANESCU A; HE J., 2020).

Atualmente, os principais medicamentos utilizados para o controle da hipertensão são os betabloqueadores, como o metoprolol e o atenolol, que bloqueiam os efeitos da adrenalina nos receptores beta do coração, atuando assim na redução da frequência cardíaca e na força das contrações cardíacas. Os bloqueadores dos canais de cálcio, como amlodipina e felodipina ajudam a relaxar os músculos das paredes dos vasos sanguíneos, bloqueando os canais de cálcio nas células musculares das artérias, impedindo que o cálcio entre nessas células e cause contração (CAREY; MORAN; WHELTON, 2022).

Já os inibidores da ECA (iECA) como o maleato de enalapril e captopril e os bloqueadores dos receptores da angiotensina (BRA), como o losartan e talmisartan, estão ligados diretamente ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que é responsável, entre outras funções pela regulação da pressão arterial, do volume de líquidos e da composição eletrolítica do corpo, ajudando a manter o equilíbrio homeostático necessário para um funcionamento corporal saudável (TE RIET et al., 2015).

1.10 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O SRAA é um sistema vital do corpo humano, pois mantém a concentração plasmática de sódio, regula a pressão arterial e o volume extracelular (MATSUZAWA et al., 2022). É composto por uma série de substâncias químicas e enzimas que interagem para controlar essas funções fisiológicas. O sistema é ativado principalmente em resposta à diminuição da pressão arterial ou à diminuição do fluxo sanguíneo nos rins, quando esses sinais são detectados, os rins liberam na corrente sanguínea a enzima renina. A renina converte o angiotensinogênio, que é produzido pelo fígado, em

angiotensina I (Ang I). A Ang I por sua vez é convertida em angiotensina II (Ang II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é encontrada principalmente nos pulmões, mas também em outros tecidos tais como em células endoteliais que revestem o interior dos vasos sanguíneos, em algumas regiões do cérebro, incluindo o hipotálamo e o tronco cerebral, e em menor grau no músculo cardíaco. Também está presente nos rins, particularmente nas células do túbulo proximal, onde desempenha um papel na regulação da reabsorção de sódio e água, afetando assim o equilíbrio de fluidos e eletrólitos no corpo. A Ang II é um potente vasoconstritor, o que significa que ela causa a constrição dos vasos sanguíneos, aumentando assim a pressão arterial. Além de seu efeito vasoconstritor, também estimula a liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais. A aldosterona atua nos rins para aumentar a reabsorção de sódio e água, o que aumenta o volume sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão arterial (AUGUSTINE et al., 2022).

Para exercer suas funções, a Ang II pode se ligar ao receptor tipo 1 de angiotensina (AT1R) que ativa rotas de vasoconstrição, hipertrofia, fibrose, proliferação, inflamação e estresse oxidativo. Por outro lado, a Ang II também pode se ligar ao receptor tipo 2 de angiotensina (AT2R), porém com efeitos contrários aos mencionados como mediados por AT1R. Outro receptor importante deste sistema é o receptor MAS, que é ativado pela angiotensina-[1-7], exercendo efeitos de vasodilatação, proteção vascular, anti-fibrose, anti-proliferação e anti-inflamação. Ambas Ang I e Ang II são convertidas em Angiotensina-[1-7] pela ECA2 (TE RIET et al., 2015). O desequilíbrio entre renina e angiotensina II pode resultar em uma grande variedade de doenças crônicas e agudas, e todos os órgãos podem ser afetados pela ativação do RAAS e pela hipertensão resultante, proliferação celular, inflamação e fibrose (HASSANI; ATTAR; FIROUZABADI, 2023).

A relação entre a COVID-19 e o SRAA é complexa já que ligação do vírus ao receptor ECA2 pode alterar a regulação normal do sistema e desencadear uma resposta inflamatória. Assim, a COVID-19 tem sido associada a disfunções no SRAA, incluindo desequilíbrios na regulação da pressão arterial, aumento da permeabilidade vascular e inflamação sistêmica (TSAMPASIAN; CORBALLIS; VASSILIOU, 2022).

Ao início da pandemia de COVID-19, os efeitos desses medicamentos que interagem diretamente com o SRAA foram questionados quanto ao seu envolvimento nas formas mais graves da doença, pois BRAs e iECA elevam os níveis de ECA2 em pacientes e este efeito poderia agravar a doença. Apesar das preocupações iniciais de que os inibidores do SRAA poderiam estar relacionados a infecções graves e eventos adversos, dados de estudos e metanálises demonstraram que seu uso é seguro em pacientes com COVID-19, mostrando um possível efeito benéfico e que devem ser continuados por todos os indivíduos que tenham uma indicação médica para seu uso (ALBASHIR, 2021; AUGUSTINE et al., 2022).

2. Justificativa

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2 surgiu como uma ameaça global significativa à saúde pública, devido à sua alta taxa de transmissão e de mortalidade. Medidas regulatórias no controle da rápida disseminação do vírus foram essenciais no período inicial e cientistas de todo o mundo rapidamente se engajaram na busca de estratégias terapêuticas para a doença. Ao longo do período de pandemia os tratamentos avançaram, mas apesar dos esforços ainda não há um tratamento específico contra o SARS-CoV-2 e a imunização com vacinas se tornou essencial para o controle da COVID-19. Porém, mesmo com a vacinação e o estado emergencial de pandemia ter chegado ao fim, ainda são necessários estudos que levem a um maior entendimento do vírus, dos seus mecanismos de infecção e também seus efeitos diretamente nas células.

Assim, como estudos prévios com SARS-CoV-1, também pertencente ao gênero *Betacoronavírus*, auxiliaram para um melhor entendimento do novo vírus, o mesmo pode ocorrer com o SARS-CoV-2. Quanto mais conhecimento dos mecanismos de infecção e interações do vírus forem sendo elucidadas, tanto em relação ao entendimento da própria doença como também possivelmente de outras doenças envolvendo novos coronavírus, melhor preparada a sociedade estará para lidar e buscar alternativas de tratamento e controle.

Sabendo que a COVID-19 acomete principalmente pessoas com comorbidades prévias, levando a maiores complicações e a até a morte, é importante priorizar estudos que envolvam estas condições, como por exemplo, pessoas que sofrem com hipertensão, e as que fazem uso contínuo de anti-hipertensivos, especialmente os iECA e BRAs, que atuam diretamente no SRAA, que tem como parte o próprio receptor do vírus, a ECA2. Muitas dúvidas acerca desta interação foram levantadas, principalmente ao início da pandemia, sobre os efeitos destes medicamentos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, visto que grande parte da população mundial os utiliza para o controle da pressão arterial. Assim, os estudos envolvendo os efeitos destes anti-hipertensivos e o SARS-CoV-2 são de extrema importância para elucidar melhor essa interação e também desvendar possíveis mecanismos envolvidos entre eles.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar se o tratamento com losartan ou maleato de enalapril em células Vero permissivas ao SARS-CoV-2 tem algum efeito na replicação do vírus, morte celular e expressão de biomarcadores.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a toxicidade dos tratamentos com losartan e maleato de enalapril nas células Vero;
- Analisar a viabilidade celular frente à infecção por SARS-CoV-2 em células Vero;
- Analisar a expressão gênica da proteína N1 de SARS-CoV-2;
- Avaliar a expressão do receptor *ACE2*;
- Avaliar a expressão gênica de IL-6, IL-18, p53, p21 e p62.

4. Capítulo 1

4.1 Artigo Científico Publicado



OPEN Losartan and enalapril maleate differently influence SARS-CoV-2-infected vero cells

Julia H. Majolo¹, João I. B. Gonçalves², Renata P. Souza¹, Laura C. González³, Nathalia Sperotto³, Maiele D. Silveira³, Sílvia D. Oliveira¹, Cristiano V. Bizarro³, Pablo Machado³, Luiz A. Basso³, Ana P. D. Souza², Jarbas R. Oliveira⁴✉ & Carlos A. S. Ferreira¹✉

Background: The COVID-19 pandemic has posed significant challenges to global healthcare systems, particularly impacting individuals with pre-existing conditions like hypertension. This study sought to assess the impact of the antihypertensive medications, losartan and enalapril maleate on SARS-CoV-2 infected cells. Vero E6 cells were infected and treated in vitro, evaluating cell viability via the MTT colorimetric assay. Additionally, the study measured relative levels of viral RNA and selected gene messenger RNAs using reverse transcriptase followed by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results:** The findings revealed that losartan substantially reduced nucleocapsid RNA levels of SARS-CoV-2 to nearly undetectable levels, while enalapril maleate did not demonstrate a significant effect. In response to viral infection, the expression of *il-18*, *p53*, *p21*, and *p62* increased compared to uninfected-untreated cells. Notably, *il-6* expression was upregulated by both infection and treatments. A comparison between infected cells treated with losartan or enalapril maleate highlighted the presence of distinct profiles in the expression of *il-6*, *p53*, *p21*, and *p62*. **Conclusions:** The data from our study suggest that these medications could interfere with certain effects triggered by SARS-CoV-2 infection in Vero E6 cells. However, their influence appears to vary both quantitatively and qualitatively in the modulation of metabolic and signal transduction pathways.

Keywords ACEi, ARB, Coronaviruses, COVID-19, Hypertension

The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) is caused by the infection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)¹. Since its emergence in 2019, SARS-CoV-2 has rapidly disseminated worldwide, leading to the COVID-19 pandemic, which, according to World Health Organization (WHO), has been associated with over 7 million deaths globally². Despite many treatments being tested or still under investigation, no highly-specific resolutive therapeutics have been found so far, deepening the challenge for healthcare systems worldwide.

COVID-19 can manifest as asymptomatic, present with mild symptoms, or progress to severe respiratory illness³. Notably, individuals with pre-existing comorbidities like lung disease, diabetes mellitus, and hypertension are at a particular risk of SARS-CoV-2 infection⁴ and have an increased likelihood of developing complications. These complications may include acute respiratory distress syndrome (ARDS), arrhythmia, shock, acute kidney injury, acute cardiac injury, liver dysfunction, and secondary infection⁵.

SARS-CoV-2 uses the angiotensin-converting enzyme II (ACE2) as a gateway to initiate replication within host cells⁶, and this protein is involved with the renin-angiotensin system (RAS). The RAS is involved in several important biological processes, such as regulation of blood pressure, renal function, water homeostasis, electrolyte balance, and inflammation⁷. ACE2 inactivates Ang II while generating Ang 1–7, a potent vasodilator that acts through the activation of the Mas receptor, serving as a negative regulator. Conversely, ACE cleaves

¹Laboratory of Immunology and Microbiology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre 90619-900, Rio Grande do Sul, Brazil. ²Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre 90619-900, Rio Grande do Sul, Brazil. ³Research Center on Molecular and Functional Biology (CPBMF), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre 90619-900, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁴Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre 90619-900, Rio Grande do Sul, Brazil. ✉email: jarbas@pucrs.br; cferreira@pucrs.br

Ang I to generate Ang II, the peptide that binds to and activates AT1R, leading to blood vessel constriction and, thereby, elevating blood pressure⁸. RAS plays an important role in the onset and progression of hypertension, affecting millions of people around the world⁹. Therapies with angiotensin receptor antagonists (ARBs) and ACE inhibitors (ACEis) are commonly prescribed for hypertension. With the outbreak of the COVID-19 pandemic, concerns arose regarding their safety for patients¹⁰. In this study, we investigated the potential impact of treatment with the ARB losartan or the ACEi enalapril maleate on SARS-CoV-2 permissive cells, focusing on virus replication, cell death, and biomarkers expression.

Materials and methods

Virus and cell line culture

The VERO E6 cell line (African green monkey kidney, BCRJ 0407) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO) and 1% penicillin-streptomycin (10,000 units/mL, GIBCO) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Infections were carried out with a SARS-CoV-2 isolate (Brazilian clinical isolate virus HIAE-02-SARS-CoV-2/SP02/human/2020/br; GenBank MT126808)¹¹. The virus was propagated at low Multiplicity of Infection (MOI) to obtain a working stock that was used in all experiments. All procedures involving viable SARS-CoV-2 were performed following the guidelines of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), USA, within a biosafety level 3 facility at the Research Center on Molecular and Functional Biology (CPBMF), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

Cell treatments

Losartan (molecular formula: C₂₂H₂₃ClN₆O; molecular weight: 422.91 g/mol) and enalapril maleate (molecular formula: C₂₀H₂₈N₂O₅; molecular weight: 376.447 g/mol) were kept at room temperature following the manufacturer's instructions. They were diluted in DMEM supplemented with 5% FBS immediately before use (no additional vehicle). In brief, confluent layers of VERO E6 were cultured for 24 h before treatment in all assays. The concentrations used were 50, 100, 250, 500 and 1000 µM and cells were harvested after 48 h of treatment. Experimental control groups consisted of infected and uninfected cells, named as infected-untreated and uninfected-untreated cells, respectively.

Cell viability assay

The cytotoxicity of the treatments on Vero E6 cells was evaluated using an MTT assay¹². Briefly, Vero E6 cells were seeded into 96-well plates (8 × 10³ cells per well) and treated as previously described. After 48 h, the medium was removed and MTT solution [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (5 mg/mL) was added, followed by incubation at 37 °C in a CO₂ incubator for 3 h, protected from light. MTT solution was discarded, and formazan crystals were dissolved with DMSO. The optical density (OD) was measured at 570 nm with a reference wavelength of 620 nm in an ELISA microplate reader (EZ Read 400; Biochrom). To calculate cell viability, all absorbance values were blank subtracted, the values of untreated cells were set to 100% and the compound-treated samples were correlated to them. Treatment concentrations resulting in cell viability levels above 80% were considered non-cytotoxic¹³.

Assessment of antiviral activity

To access the antiviral activity in VERO E6, cells were seeded at density of 8 × 10³ per well in 96-well plates. The medium was removed, and cells were infected with a MOI of 0.1 in 200 µL of medium, which contained either losartan, enalapril maleate, or only medium (infected-untreated). For uninfected-untreated cells, 200 µL of medium was added as well. At 48 h post infection (h.p.i.), cell viability was measured by MTT assay, as previously described¹⁴. A dose-response curve was generated with GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) to calculate the concentration of the compound that inhibited 50% of the infection (EC50).

Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Cells were seeded in triplicates at a density of 8 × 10⁴ per well in 24-well plates. The medium was removed, and cells were infected in triplicate with a MOI of 0.1 in 400 µL of medium containing either losartan or enalapril maleate, or only medium (infected-untreated). The uninfected-untreated cells received only medium. At 48 h.p.i, cells were harvested, and total RNA was extracted using TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, USA) following the manufacturer's protocol. The RNA extracted was then reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using the GoScript™ Reverse Transcription System kit (Promega, USA). The amplification of cDNA from SARS-CoV-2 was performed using the TaqMan Master Mix kit in StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) with N1 SARS as target gene and RNaseP as the endogenous control. The relative expression levels of interleukine-6 (IL-6), interleukine-18 (IL-18), TP53 or p53, cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A) or p21, and sequestosome 1 (SQSTM1) or p62 genes were determined using PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix kit in StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). For ACE2, the TaqMan Master Mix kit in StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) was employed, with β-actin (actb) used as the endogenous control. The mean Ct values were used to calculate the relative expression of the target genes normalized by the internal control using the 2^{-ΔΔCt} formula¹⁵. Primer sequences used in the qRT-PCR analyses are indicated in Supplementary Table 1.

Statistical analysis

Experiments were independently repeated at least three times, with each as a pool of three cultures. The data were summarized as the mean and standard error of the mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-hoc test or Kruskal-Wallis for multiple comparisons was used to compare the means

between groups. Statistical significance was accepted at a level of $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

In vitro effect of losartan and enalapril maleate on SARS-CoV-2 infection and cell viability

The viability of Vero E6 cells was evaluated by the MTT assay after exposure to losartan or enalapril maleate (Fig. 1A). The results demonstrated a viability exceeding 80% at all concentrations tested for both compounds, indicating their non-toxic nature to the cells (Fig. 1B–C). Notably, even at the highest concentration tested (1000 μM), the relative cell viability compared to untreated cells was 85% for losartan and 97% for enalapril maleate.

Viral infection reduced cell viability relative to uninfected cells in about 55%. Losartan treatment resulted in cell viability levels of 67% (500 μM) and 61% (1000 μM) of infected cultures (Fig. 1B), presenting an EC₅₀ of 350 μM . Concerning the enalapril maleate treatments, cell viability presented levels of 69% (500 μM) and 70% (1000 μM) (Fig. 1C), with an EC₅₀ of 190 μM .

Effect of losartan and enalapril maleate in levels of SARS-CoV-2 RNA

We evaluated the effect of treatments on SARS-CoV-2 RNA levels targeting the N1 gene. Losartan at 1000 μM significantly attenuated the infection ($p = 0.0338$) (Fig. 2A), whereas enalapril maleate treatment showed no statistical difference at any concentration (Fig. 2B).

Effect of losartan and enalapril maleate in the relative expression of the ACE2 gene

The influence of the treatments was also evaluated concerning the relative mRNA levels of the virus receptor, ACE2. Our analysis revealed that *ace2* expression was significantly elevated in infected-untreated cells ($p < 0.0001$). This elevation can also be seen in all treatments compared to uninfected-treated cells ($p < 0.0003$) compared to uninfected-untreated cells. Both treatments showed reduced levels of ACE2 mRNA compared to

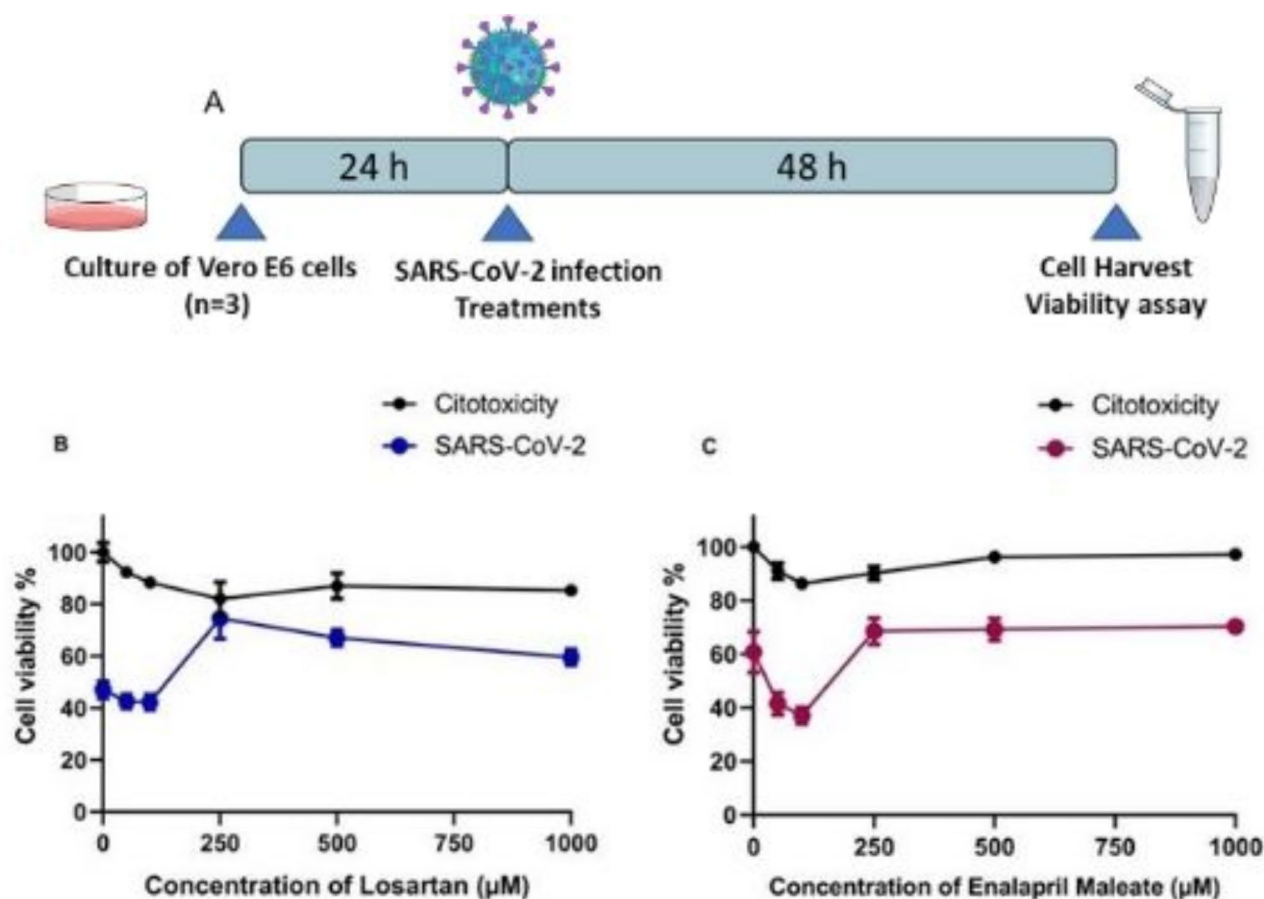


Fig. 1. Effect of losartan and enalapril maleate on SARS-CoV-2 infection and cell viability. Representative scheme of timeline of infection and treatments (A). Percentage of inhibition of SARS-CoV-2 replication (MOI = 0.1) and cytotoxicity with losartan (B) and enalapril maleate (C) on Vero E6 cells. Cell viability and infection inhibition were assessed using the MTT assay. Compound toxicity was concurrently evaluated in comparison with untreated-uninfected cells. Non-linear regression analysis was applied, and experiments were performed in triplicates. The data represent mean differences from four independent experiments and are presented as the mean $\pm$ SEM. A p-value less than 0.05 was considered significant.

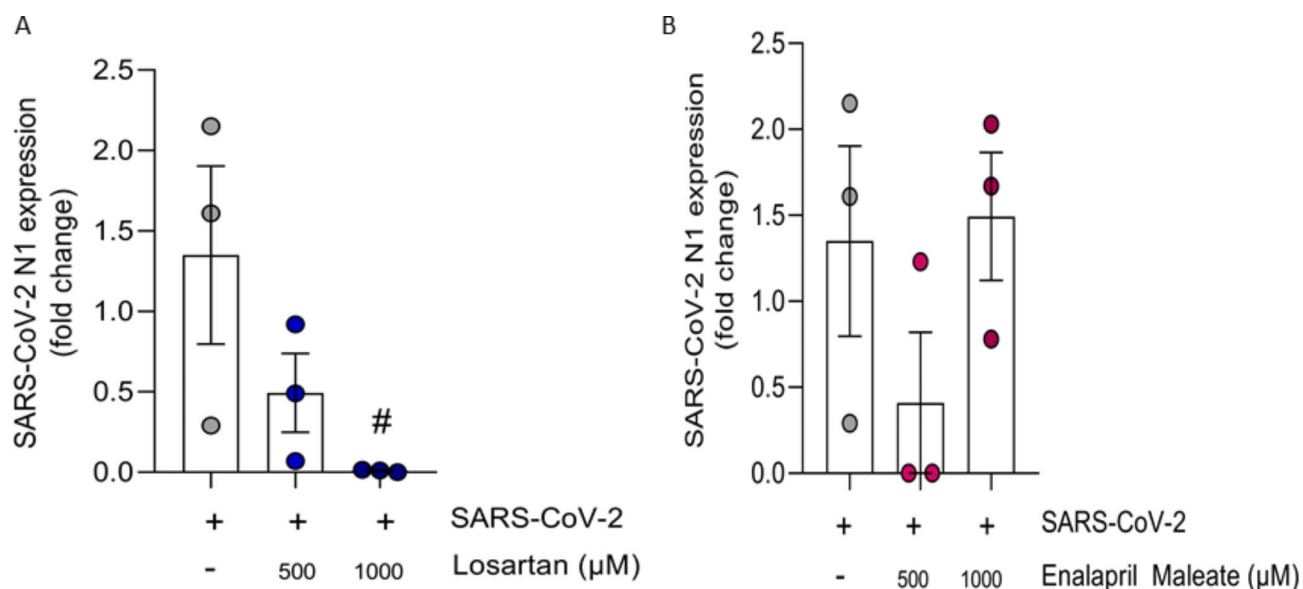


Fig. 2. Effect of losartan and enalapril maleate in relative viral expression of SARS-CoV-2. Mean differences in SARS-CoV-2 N1 (virus nucleocapsid) gene expression detected by real time PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in infected (MOI=0.1) Vero E6 cell cultures untreated and after 48 h of incubation with losartan (A) or enalapril maleate (B). The data represent mean differences from three independent experiments, presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance between groups was determined by one-way ANOVA followed by the post-hoc test of Kruskal-Wallis ($p < 0.05$ considered significant).

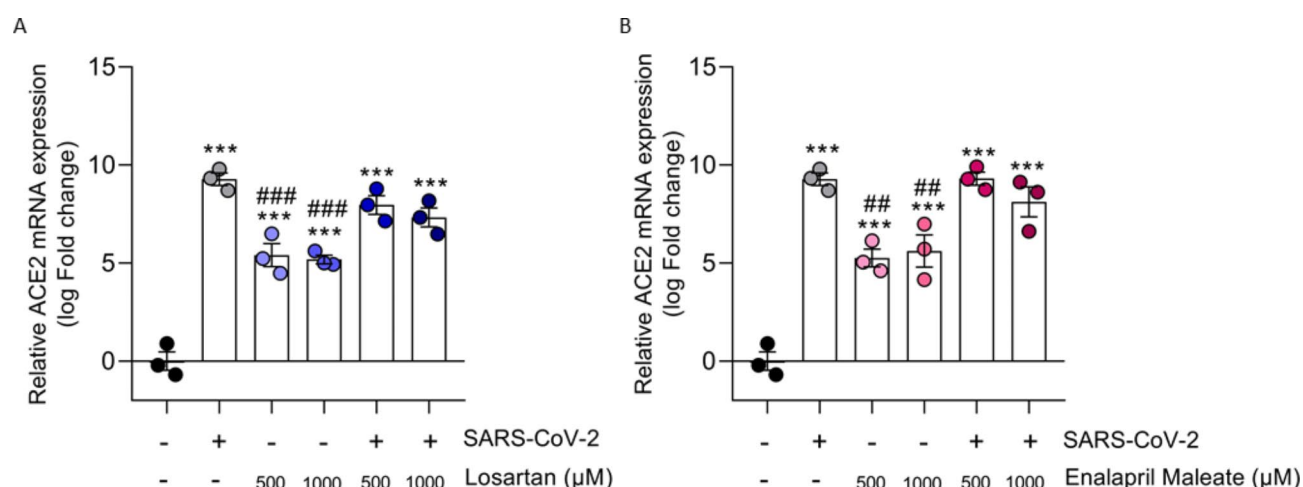


Fig. 3. Effect of SARS-COV-2 infection and treatments in the relative expression of ACE2 gene. Gene expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) detected by real time PCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Vero E6 cells following infection (MOI=0.1) and 48 h incubation with losartan (A) or enalapril maleate (B). The data are representative of mean differences from three independent experiments and are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance between groups was determined using one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. A p-value less than 0.05 was considered significant. *** $P < 0.001$ comparison versus uninfected-untreated cells; $^aP < 0.05$, $^{aa}P < 0.01$ comparison versus uninfected-treated 500 μ M; $^bP < 0.05$ comparison versus uninfected-treated 1000 μ M.

infected-untreated cells ($p < 0.006$), whereas infected-treated cells showed no significant difference compared to infected cells (Fig. 3A-B).

Relative expression of the IL-6, IL-18, p53, p21 and p62 genes

The analyses of IL-6, IL-18, p53, p21 and p62 mRNA levels revealed different profiles of gene expression. Infected-untreated cells showed an upregulation on the expression of *il-6* ($p < 0.001$) when compared to uninfected-untreated cells (Fig. 4A-B). All treated groups showed an increase in the expression of *il-6* ($p < 0.01$) compared

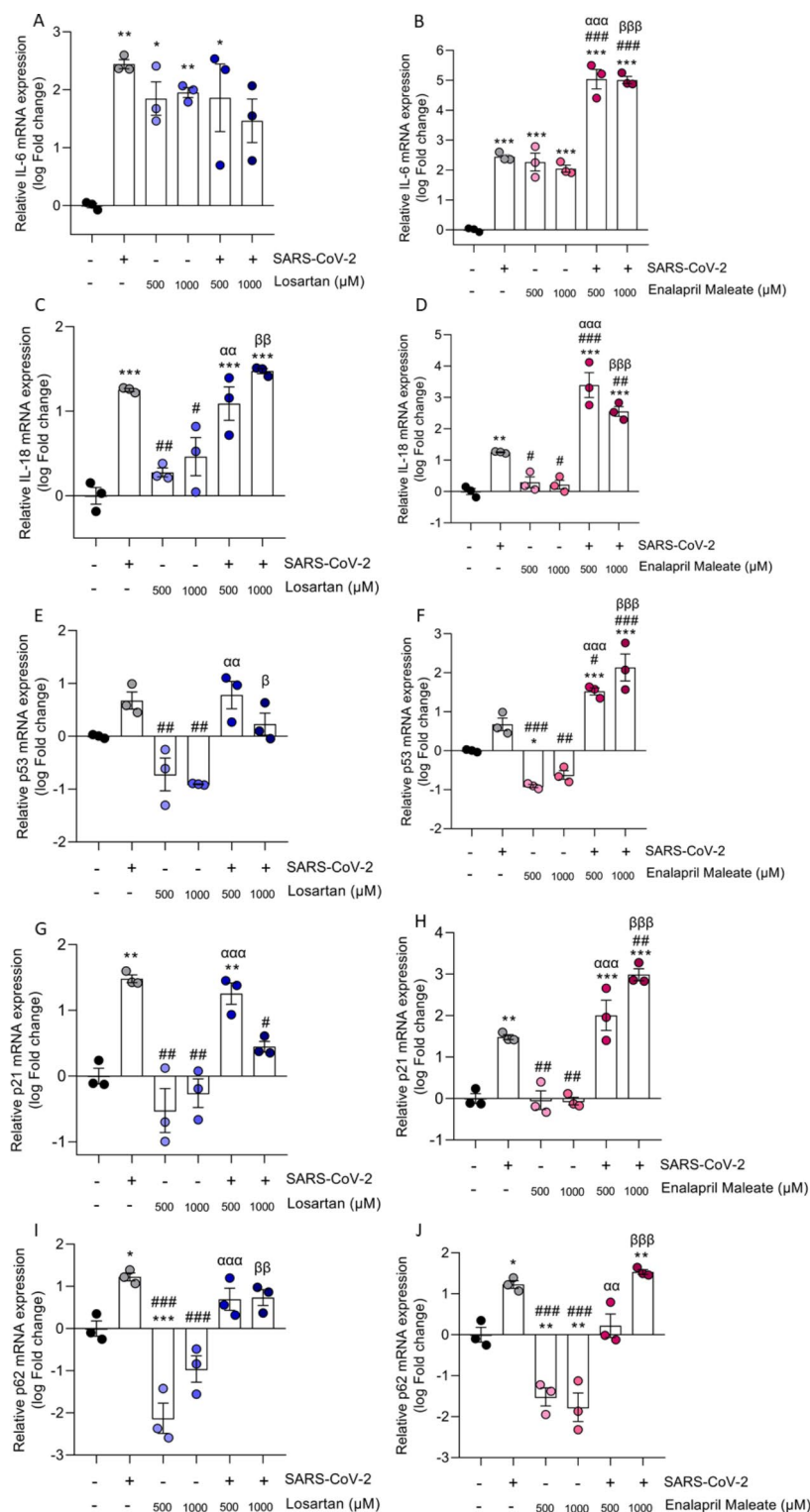


Fig. 4. Effect of SARS-COV-2 infection and treatments in the relative expression of IL-6, IL-18, p53, p21 and p62 genes. Gene expression of IL-6, IL-18, p53, p21 and p62 detected by real time PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) in Vero E6 cells following infection (MOI=0.1) and 48 h incubation with losartan (A, C, E, G, I) or enalapril maleate (B, D, F, H, J). The data represent mean differences from three independent experiments and are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance between groups was determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level set at $p < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus uninfected-non treated cells; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ versus infected-non treated cells; $^{\alpha}P < 0.05$, $^{\alpha\alpha}P < 0.01$, $^{\alpha\alpha\alpha}P < 0.001$ versus uninfected treated 500 μ M; $^{\beta}P < 0.05$, $^{\beta\beta}P < 0.01$, $^{\beta\beta\beta}P < 0.001$ versus uninfected treated 1000 μ M.

to the infected-untreated group, except for the infected cells treated with losartan at 1000 μM (Fig. 4A). Infected-losartan treated cells presented no difference of IL-6 mRNA levels compared to both infected-untreated and uninfected-losartan treated cells (Fig. 4A), whereas, in contrast, infected-enalapril maleate treated cells presented higher IL-6 mRNA levels ($p < 0.001$) (Fig. 4B).

The viral infection generated an increase in IL-18 gene expression compared to uninfected cells ($p < 0.009$) (Fig. 4C-D). Concerning treatments, infected-losartan treated cells did not show different values compared to infected cells (Fig. 4C), contrasting with infected-enalapril maleate treated cells that presented higher IL-18 mRNA levels (500 μM , $p < 0.0001$; 1000 μM , $p = 0.0064$) (Fig. 4D).

Unlike IL-6 and IL-18, infected and uninfected cells did not show statistically significant differences in p53 gene expression. Among uninfected-treated cell groups, only 500 μM enalapril maleate-treated cells showed significant differences comparing to uninfected cells, presenting lower mRNA levels ($p = 0.023$). Infected-enalapril maleate treated cells, on the other hand, showed an increase in p53 gene expression comparing with both infected-untreated or uninfected-enalapril maleate treated cells, especially at 1000 μM (500 μM , $p = 0.035$; 1000 μM , $p = 0.0005$) (Fig. 4E-F).

Concerning the expression of the p21 gene, infected cells showed an upregulation ($p = 0.0018$), whereas uninfected-treated cells did not show significant differences compared to uninfected cells (Fig. 4G-H). Analyzing the treatments in the infected cell groups, losartan treated cells at the concentration of 500 μM presented similar mRNA levels of infected cells, but at 1000 μM , cells presented lower mRNA levels ($p = 0.019$) and no difference to uninfected cells (Fig. 4G). Uninfected-enalapril maleate treated cells did not show differences compared to uninfected cells, but infected and treated cells presented higher mRNA levels compared to the uninfected-untreated group ($p < 0.0001$) (Fig. 4H). Similar to the p53 gene findings, infected-1000 μM enalapril maleate treated cells showed an increase in p21 gene expression when compared to infected-untreated cells ($p = 0.0016$), and infected-enalapril maleate treated cell groups showed higher levels than the respective uninfected-enalapril maleate treated cell groups ($p < 0.0001$) (Fig. 4H).

The viral infection also raised the expression of the p62 gene, as can be seen comparing data from uninfected-untreated and infected-untreated cells ($p < 0.004$) (Fig. 4I-J). When comparing treated and untreated uninfected cells, the former showed a downregulation ($p < 0.004$), except for 1000 μM losartan, which did not reach a significant reduction. In relation to infected cells, treatments did not affect p62 expression when compared to infected-untreated cells, although they also did not exhibit differences from uninfected-untreated cells, with the exception of infected-1000 μM enalapril maleate treated cells ($p = 0.0040$) (Fig. 4I-J).

Discussion

Since the emergence of the pandemic caused by SARS-CoV-2, the scientific community has raised numerous questions about the safety and influence on patient outcomes in those undergoing treatment with ARBs or ACEIs. These concerns about chronic treatments led to evaluations supporting the safety of these drugs, advocating for their continued use^{16,17}. Their administration was not associated with an increased risk of mortality, ICU admission, or mechanical ventilation compared to controls^{18,19}. Furthermore, it is suggested that the treatment may have a protective role, although the association with recovery and survival is modest²⁰. In patients previously diagnosed with hypertension and hospitalized due to COVID-19, those treated with ACEI/ARB exhibited a lower risk of mortality compared to ACEI/ARB nonusers^{10,21}, with estimates suggesting a mortality risk more than five times smaller²². These findings suggest that ARBs and ACEIs may positively influence the outcome of patients with COVID-19, but the mechanisms behind these findings are still not well understood.

Some studies suggest that the ACE2 receptor availability could be influenced by antihypertensive drugs. For example, hypertensive patients treated with the AT1R antagonist showed higher urinary ACE2 levels²³, and chronic AT1R blockade results in ACE2 upregulation in humans²⁴. Corroborating these results, our study demonstrated that losartan and enalapril maleate treatment in primate kidney Vero cells, a common model for SARS-CoV-2 replication, led to the same upregulation. On the other hand, despite the upregulation of *ace2*, we observed that infected-1000 μM losartan treated cells presented almost undetectable RNA levels of SARS-CoV-2 in vitro, an effect that was seen previously²⁵. In this context, losartan could attenuate SARS-CoV-2 infection in proximal tubule cells of pluripotent stem cell-derived kidney organoids and prevent the internalization of ACE2²⁶. In contrast, enalapril maleate treatments, at the tested concentrations, did not show significant differences in viral RNA levels. Hence, any protective effect it may present to patients are not related to the inhibition of virion production, suggesting that enalapril maleate might operate through distinct signal transduction pathways compared to losartan.

One important and widely recognized mechanism triggering acute respiratory distress syndrome and organ damage in COVID-19 is cytokine release syndrome (CRS)⁵. Pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-18, are known to be upregulated in COVID-19 patients, with IL-6, in particular, strongly correlated with disease severity^{27,28}. Furthermore, these cytokines play a central role in the development of CRS in the later phase of the disease²⁹ and may correspond to one of the consequences of infection-induced cellular senescence³⁰. The data presented here indicate that virus infection increased the expression of both *il-6* and *il-18*, whereas the treatments alone were able to increase mRNA levels solely of *il-6*. A remarkable difference between treatments is the lack of any additive or synergic effect in infected-losartan treated cells' mRNA levels, contrasting with the higher expression of both *il-6* and *il-18* in infected-enalapril maleate treated cells. Therefore, losartan and enalapril maleate do not seem to control or revert IL-6/IL-18 production in infected cells, and their eventual protective effects are not likely to come from an anti-inflammatory activity. Indeed, they seem to be proinflammatory in Vero cells, especially enalapril maleate. Conversely, previous literature data show that different tissues/cells presented lower levels of IL-6 or IL-18 in response to losartan^{31,32} or enalapril treatments^{33–35}, emphasizing that every cell and/or tissue niche environment may respond differently to a common stimulus.

Viral infection is a complex and exceptionally dynamic process, capable of regulating the progression of the host cell cycle at various phases of infection based on the replication requirements³⁶. SARS-CoV viruses, for example, can disrupt cellular processes responsible for regulating antiviral responses³⁷ and many viruses developed intricate mechanisms to control the functions of p53, a key molecule for cell homeostasis and immune regulation³⁸. When the availability of p53 is reduced, cell survival is enhanced, immune responses may be evaded, and virus replication and spread within the host are facilitated³⁹. This scenario was evident in mice lacking p53, which displayed increased susceptibility to coronavirus infection⁴⁰. Moreover, it has been demonstrated that p53 acts to inhibit these viruses and, when activated, it regulates a variety of biological process, including DNA damage repair, cell cycle interruption, apoptosis, and senescence^{41,42}.

p53 is widely recognized as a key molecule for cell homeostasis and immune regulation³⁸, and its interaction with other proteins is of paramount importance, in particular with the cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A), also known as p21⁴³. p21 has multiple functions, including the capability to inhibit CDK-cyclin activity, thus directly restraining DNA replication and arresting the cell cycle^{44,45}. In response to cellular stress or damage, p53 activates p21, which, in turn, halts the cell cycle, allowing time for DNA repair or apoptosis to occur⁴⁵. p53 is negatively regulated by mdm2, contributing to the balance of p53 levels⁴⁶. Concerning to SARS-CoV-2, infected alveolar basal epithelial cells presented a decrease in p53 levels and, when treated with mdm2 inhibitors, showed to raise p53 levels and activate p53-dependent pathways, therefore, leading to cell cycle block, inhibition of virion release, and reduced expression of the IL-6, NF- κ B and IFN- λ genes⁴⁷. Here, we demonstrated that infected Vero cells do not present a decrease in p53 mRNA levels and, corroborating with the idea of a possible protective influence, the overexpression of p53 in Vero cells has already been shown to reduce virion production⁴⁸. Therefore, the enhancement of p53 mRNA levels in infected-enalapril maleate treated cells may be linked to a better antiviral response, which was not seen in infected-losartan treated cells. On the other hand, this assumption may be taken with some caution, as SARS-CoV-2 has been suggested to subvert the p53 machinery as part of a “kidnap and exploit” strategy, avoiding viral cycle blockage and using p53-derived pathways to benefit progeny generation⁴⁹. This mechanism may help explain why higher p53 levels do not correlate with reduced viral RNA levels in enalapril maleate treated cells. In fact, SARS-CoV-2 N protein was suggested to induce acute kidney injury by a mechanism dependent on p21 upregulation⁵⁰. We showed that p21 mRNA levels were upregulated following viral infection in Vero cells, including infected-treated cells, with the exception of 1000 μ M losartan treated cells. Interestingly, only 1000 μ M losartan treated cells also showed almost undetectable SARS-CoV-2 RNA molecules. It should be further emphasized that both uninfected-enalapril maleate and uninfected-losartan treated cells displayed similar lower p53 gene expression profiles than infected-untreated cells. However, only uninfected-500 μ M enalapril maleate treated cells showed statistically significant downregulation compared to uninfected-untreated cells. Downregulation of p53 by enalapril maleate was already reported in rat kidney tissues, concurrent with an anti-inflammatory profile⁵¹. Moreover, losartan has also been shown to downregulate p53 and p21 in human glomerular mesangial cells, suggesting a role in preventing premature replicative cell senescence⁵².

Another regulatory mechanism that SARS-CoV-2 can interfere with is autophagy, an essential process for maintaining cellular homeostasis and contributing to the cellular antiviral response^{53,54}. Autophagy involves various autophagy-related genes, such as sequestosome 1 (SQSTM1), also known as p62, which acts as an autophagic receptor, playing a crucial role in targeting structures for degradation within autophagosomes⁵⁵. Data presented in this study indicate that SARS-CoV-2 infection of Vero cells increases p62 expression, as already described for Vero and other cell lineages^{54,56}, in a process that seem to subvert the general pathway of autophagolysosome function and viral clearance^{57,58}. Despite this upregulation, infected cells treated with losartan or enalapril maleate showed p62 mRNA levels not statistically different from uninfected-untreated cells, except for enalapril maleate treatment at the concentration of 1000 μ M. In this sense, in vivo and in vitro analyses showed that autophagy inhibition suppresses SARS-CoV-2 replication⁵⁹. Lowering p62 levels may contribute to constraining the virus. Furthermore, as losartan and enalapril maleate treatments can downregulate this gene compared to untreated cells, the infection of pre-treated cells (or possibly patients under continuous medication use) may face a more challenging scenario in subverting the autophagic scaffold.

Conclusions

The intricate details of how SARS-CoV-2 manipulates the p53 and p62 pathways are just beginning to emerge, and so far, there is limited clinical evidence demonstrating the real impact of antihypertensive treatments on the prognosis of COVID-19. Our data suggest that these drugs can interfere with and balance some of the effects caused by SARS-CoV-2 infection in Vero cells, particularly in proteins essential for keeping cellular homeostasis. Therefore, the chronic use of these molecules by patients probably modifies the metabolic scenario and cell response profile typically encountered by SARS-CoV-2 within host cells. Additionally, although both molecules act on the RAS, they modulate differently metabolic/signal transduction pathways. Nevertheless, further research is needed to determine the effect of antihypertensive medications on the course of COVID-19 in various cell types. This exploration is crucial for unraveling how the mechanisms modulated by these drugs influence patient outcomes.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 1 July 2024; Accepted: 15 October 2024

Published online: 22 October 2024

References

- Bogoch, I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: Potential for international spread via commercial air travel. *J. Travel Med.* **27**, taa008. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa008> (2020).
- World Health Organization (WHO). Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/> Accessed 6 Feb 2024.
- Yang, X. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: A single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* **8**, 475–481. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5) (2020).
- Lelapi, N. et al. Cardiovascular disease as a biomarker for an increased risk of COVID-19 infection and related poor prognosis. *Biomark. Med.* **14**, 713–716. <https://doi.org/10.2217/bmm-2020-0201> (2020).
- Ye, Q., Wang, B. & Mao, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine storm' in COVID-19. *J. Infect.* **80**, 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037> (2020).
- Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. **579**, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7> (2020).
- Matsuzawa, Y., Kimura, K., Ogawa, H. & Tamura, K. Impact of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on COVID-19. *Hypertens. Res.* **45**, 1147–1153. <https://doi.org/10.1038/s41440-022-00922-3> (2022).
- Santos, R. A. S. et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 8258–8263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1432869100> (2003).
- Mills, K. T., Stefanescu, A. & He, J. The global epidemiology of hypertension. *Nat. Rev. Nephrol.* **16**, 223–237. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0244-2> (2021).
- Zhang, P. et al. Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19. *Circ. Res.* **126**, 1671–1681. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317134> (2020).
- Antunes, K. H. et al. Short-chain fatty acid acetate triggers antiviral response mediated by RIG-I in cells from infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *EBioMedicine*. **77**, 103891. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103891> (2022).
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol. Biol.* https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20 (2011). 731:237–45.
- Marín-Palma, D. et al. Curcumin inhibits in vitro SARS-CoV-2 infection in Vero E6 cells through multiple antiviral mechanisms. *Molecules*. **26**, 6900. <https://doi.org/10.3390/molecules26226900> (2021).
- Ogando, N. S. et al. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology. *J. Gen. Virol.* **101**, 925–940. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001453> (2020).
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73> (2008).
- Dublin, S. et al. Renin – angiotensin – aldosterone system inhibitors and COVID-19 infection or hospitalization: A cohort study. *Am. J. Hypertens.* **34**, 339–347. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa168> (2021).
- Flacco, M. E. et al. Treatment with ACE inhibitors or ARBs and risk of severe / lethal COVID-19: A meta- analysis. *Heart*. **106**, 1519–1524. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2020-317336> (2020).
- Dambha-Miller, H. et al. Mortality from angiotensin-converting enzyme-inhibitors and angiotensin receptor blockers in people infected with COVID-19: A cohort study of 3.7 million people. *Fam. Pract.* **40**, 330–337. <https://doi.org/10.1093/fampra/cmca094> (2023).
- Paguio, J. A., Casipit, B. A., John, T. A., Balu, A. & Lo, K. B. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: An updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **21**, 219–226. <https://doi.org/10.1080/14779072.2023.2184351> (2023).
- Peñalvo, J. L. et al. Insights into the association of ACEIs / ARBs use and COVID-19 prognosis: A multistate modelling study of nationwide hospital surveillance data from Belgium. *BMJ Open*. **11**, e053393. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-053393> (2021).
- Baral, R. et al. Association between renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and clinical outcomes in patients with COVID-19: A systematic review and Meta-analysis. *JAMA Netw. Open*. **4**, e213594. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.3594> (2021).
- Mirjalili, M., Soodejani, M. T., Raadabadi, M., Dehghani, A. & Salemi, F. Does Losartan reduce the severity of COVID-19 in hypertensive patients? *BMC Cardiovasc. Disord.* **22**, 16. <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02548-2> (2022).
- Furuhashi, M. et al. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in hypertensive patients may be increased by Olmesartan, an angiotensin II receptor blocker. *Am. J. Hypertens.* **28**, 15–21. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu086> (2014).
- Gurwitz, D. Angiotensin receptor blockers as tentative SARS-CoV-2 therapeutics. *Drug Dev. Res.* **81**, 537–540. <https://doi.org/10.1002/ddr.21656> (2020).
- Nejat, R. et al. Losartan inhibits SARS-CoV-2 replication in vitro. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **24**, 390–399. <https://doi.org/10.18433/jpps31931> (2021).
- Rahmani, W. et al. Attenuation of SARS-CoV-2 infection by losartan in human kidney organoids. *IScience*. **25**, 103818. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103818> (2022).
- Aziz, M., Fatima, R. & Assaly, R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J. Med. Virol.* **92**, 2283–2285. <https://doi.org/10.1002/jmv.25948> (2020).
- Liang, S. et al. SARS-CoV-2 spike protein induces IL-18-mediated cardiopulmonary inflammation via reduced mitophagy. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **8**, 108. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01368-w> (2023).
- Broman, N. et al. IL-6 and other biomarkers as predictors of severity in COVID-19. *Ann. Med.* **53**, 410–412. <https://doi.org/10.1080/07853890.2020.1840621> (2021).
- Evangelou, K. et al. Pulmonary infection by SARS-CoV-2 induces senescence accompanied by an inflammatory phenotype in severe COVID-19: Possible implications for viral mutagenesis. *Eur. Respir J.* **60**, 2102951. <https://doi.org/10.1183/13993003.02951-2021> (2022).
- Cardoso, P. R. G. et al. Losartan, but not Enalapril and Valsartan, inhibits the expression of IFN- γ , IL-6, IL-17F and IL-22 in PBMCs from rheumatoid arthritis patients. *Open. Rheumatol. J.* **12**, 160–170. <https://doi.org/10.2174/1874312901812010160> (2018).
- Valente, A. J. et al. Angiotensin II enhances AT 1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT 1, Nox1, and interleukin-18. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **303**, 282–296. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00231.2012> (2012).
- Ding, L. H. et al. Enalapril inhibits tubulointerstitial inflammation and NLRP3 inflammasome expression in BSA-overload nephropathy of rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 1293–1301. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.66> (2014).
- Mitchell, G. F. et al. Hemodynamic effects of sacubitril-valsartan versus enalapril in patients with heart failure in the EVALUATE-HF study: Effect modification by left ventricular ejection fraction and sex. *Circ. Heart Fail.* **14**, E007891. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.120.007891> (2021).
- Panico, K. et al. Cardiac inflammation after ischemia-reperfusion of the kidney: Role of the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system. *Cell. Physiol. Biochem.* **53**, 587–605. <https://doi.org/10.33594/00000159> (2019).
- Su, M. et al. A mini-review on cell cycle regulation of coronavirus infection. *Front. Vet. Sci.* **7**, 586826. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.586826> (2020).

37. Chen, C. J. & Makin, S. Murine coronavirus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase. *J. Virol.* **78**, 5658–5669. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.11.5658-5669.2004> (2004).
38. Sato, Y. & Tsurumi, T. Genome guardian p53 and viral infections. *Rev. Med. Virol.* **23**, 213–220. <https://doi.org/10.1002/rmv.1738> (2013).
39. Wang, X., Liu, Y., Li, K. & Hao, Z. Roles of p53-mediated host–virus interaction in coronavirus infection. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 6371. <https://doi.org/10.3390/ijms24076371> (2023).
40. Ma-Lauer, Y. et al. P53 down-regulates SARS coronavirus replication and is targeted by the SARS-unique domain and PLpro via E3 ubiquitin ligase RCHY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E5192–E5201 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1603435113>
41. Beck, J., Horikawa, I. & Harris, C. Cellular senescence: Mechanisms, morphology, and mouse models. *Vet. Pathol.* **57**, 747–757. <https://doi.org/10.1177/0300985820943841> (2020).
42. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper review for growth and division. *Cell.* **88**, 323–331. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1) (1997).
43. Karimian, A., Ahmadi, Y. & Yousefi, B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair.* **42**, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008> (2016).
44. El-Deiry, W. S. p21(WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy. *Cancer Res.* **76**, 5189–5191. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2055> (2016).
45. Engeland, K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell. Death Differ.* **29**, 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z> (2022).
46. Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M. & Zhang, R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J. Biomed. Res.* **27**, 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030> (2013).
47. Lodi, G. et al. Cell cycle block by p53 activation reduces SARS-CoV-2 release in infected alveolar basal epithelial A549-hACE2 cells. *Front. Pharmacol.* **13**, 1018761. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1018761> (2022).
48. Kumar, A., Grams, T. R., Bloom, D. C. & Toth, Z. Signaling pathway reporter screen with SARS-CoV-2 proteins identifies nsp5 as a repressor of p53 activity. *Viruses.* **14**, 1039. <https://doi.org/10.3390/v14051039> (2022).
49. Cardozo, C. M. & Hainaut, P. Viral strategies for circumventing p53: The case of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr. Opin. Oncol.* **33**, 149–158. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000713> (2021).
50. Wang, W. et al. SARS-CoV-2 N protein induces acute kidney injury via Smad3-Dependent G1 cell cycle arrest mechanism. *Adv. Sci.* **9**, 2103248. <https://doi.org/10.1002/adv.202103248> (2022).
51. Ahmed, S. et al. Apoptosis induced by luteolin in breast cancer: Mechanistic and therapeutic perspectives. *Phytomedicine.* **59**, 152883. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152883> (2019).
52. Feng, X., Wang, L. & Li, Y. Change of telomere length in angiotensin II-induced human glomerular mesangial cell senescence and the protective role of losartan. *Mol. Med. Rep.* **4**, 255–260. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.436> (2011).
53. Choi, Y., Bowman, J. W. & Jung, J. U. Autophagy during viral infection - A double-edged sword. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 341–354. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0003-6> (2018).
54. Qu, Y. et al. ORF3a-mediated incomplete autophagy facilitates severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 replication. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 716208. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716208> (2021).
55. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell.* **137**, 1001–1004. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.023> (2009).
56. Zambalde, É. P. et al. Increased mTOR signaling and impaired autophagic flux are hallmarks of SARS-CoV-2 infection. *Curr. Issues Mol. Biol.* **45**, 327–336. <https://doi.org/10.3390/cimb45010023> (2023).
57. Kočí, J., Novotová, M., Sláviková, M., Klempa, B. & Zahradník, I. SARS-CoV-2 exploits non-canonical autophagic processes to replicate, mature, and Egress the infected Vero E6 cells. *Pathogens.* **11**, 1535. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121535> (2022).
58. Wang, N., Shibata, Y., Paulo, J. A., Gygi, S. P. & Rapoport, T. A. A conserved membrane curvature-generating protein is crucial for autophagosome formation in fission yeast. *Nat. Commun.* **14**, 4765. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40530-4> (2023).
59. Shang, C. et al. Inhibition of autophagy suppresses SARS-CoV-2 replication and ameliorates pneumonia in hACE2 transgenic mice and xenografted human lung tissues. *J. Virol.* **95**, e01537–e01521. <https://doi.org/10.1128/JVI.01537-21> (2021).
60. Ding, S. et al. IL-8 is involved in estrogen-related receptor α -regulated proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Dig. Dis. Sci.* **62**, 3438–3446. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4779-4> (2017).
61. Lv, G., Zhu, G., Xu, M., Gao, X. & Xiao, Q. Inhibition of carrageenan-induced dental inflammatory responses owing to decreased TRPV1 activity by dexmedetomidine. *J. Inflamm.* **17**, 18. <https://doi.org/10.1186/s12950-020-00245-5> (2020).
62. Costa, B. P. et al. Fructose-1,6-bisphosphate induces generation of reactive oxygen species and activation of p53-dependent cell death in human endometrial cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* **41**, 1050–1062. <https://doi.org/10.1002/jat.4091> (2021).
63. Costa, B. P. et al. Methoxyeugenol regulates the p53/p21 pathway and suppresses human endometrial cancer cell proliferation. *J. Ethnopharmacol.* **267**, 113645. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113645> (2021).
64. Li, T. et al. Aggravation of acute kidney injury by mPGES-2 down regulation is associated with autophagy inhibition and enhanced apoptosis. *Sci. Rep.* **7**, 10247 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10271-8> (erratum in: *Sci Rep.* **2018**; **8**:17228. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35440-1>).
65. Kim, J. S. et al. Prognostic significance of LC3B and p62/SQSTM1 expression in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res.* **39**, 6711–6722. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13886> (2019).

Acknowledgements

We thankfully acknowledge to Vanessa Fey, Maila Pacheco Dias e Maria Cláudia Garcia for technical assistance.

Author contributions

Conceptualization, C.F., J.O. and J.M.; methodology, J.M., L.G., N.S., M.S. and J.G.; validation, C.F., J.O., J.M., J.G., L.G., N.S., M.S., R.S., S.O., C.B., P.M., L.B., A.S.; formal analysis, J.M., J.O., C.F.; investigation, J.M., L.G., N.S., M.S. and J.G.; data curation, C.F. and J.M.; writing—original draft preparation, C.F. and J.M.; writing – review & editing, C.F., J.M., R.S.; visualization, C.F., J.O., J.M., J.G., R.S., S.O., C.B., P.M., L.B., A.S.; supervision, J.O., C.F. All authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

Funding

This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil [Finance Code 001], and CNPq.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76657-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.R.O. or C.A.S.F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024

5. Considerações Finais e Perspectivas

Desde o surgimento da pandemia de COVID-19, muitas dúvidas e preocupações surgiram sobre o impacto dos inibidores do SRAA, como os BRAs e iECA, em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 (ZHANG et al., 2021). Estudos indicam que esses medicamentos podem influenciar a expressão do receptor ECA2, utilizado pelo SARS-CoV-2 para entrar nas células hospedeiras (FURUHASHI et al., 2015). No entanto, evidências sugerem que tais tratamentos não aumentam o risco de complicações graves da COVID-19 e podem, na verdade, estar associado a melhores resultados em pacientes hospitalizados (BARAL et al., 2021). Além disso, esses medicamentos podem afetar vias inflamatórias e de autofagia, que desempenham um papel na resposta imune e na eliminação viral (QU et al., 2021). Entretanto, o funcionamento destes mecanismos e seus respectivos efeitos específicos ainda não estão completamente compreendidos.

Nossos dados sugerem que esses medicamentos podem interferir e equilibrar alguns dos efeitos causados pela infecção por SARS-CoV-2 em células Vero, particularmente em proteínas essenciais para manter a homeostase celular. Portanto, o uso crônico dessas moléculas pelos pacientes provavelmente modifica o cenário metabólico e o perfil de resposta celular normalmente encontrados pelo SARS-CoV-2 dentro das células hospedeiras.

Embora o tratamento com BRAs ou iECAs possa aumentar a expressão do ECA2, isso não parece aumentar a replicação viral. Por exemplo, o losartan foi capaz de atenuar a infecção pelo SARS-CoV-2 em células renais, mesmo aumentando a expressão do receptor nas células. O maleato de enalapril, diferentemente, não mostrou efeitos significativos na replicação viral. De qualquer forma, o aumento putativo do número de receptores não resultou em níveis maiores de replicação viral. Além disso, a infecção pelo SARS-CoV-2 desencadeia uma resposta inflamatória exacerbada, envolvendo citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-18 (AZIZ et al., 2020; LIANG et al., 2023). Embora os tratamentos possam influenciar essas vias inflamatórias, os resultados até agora não indicam uma supressão significativa da inflamação. Pelo contrário, o maleato de enalapril parece até mesmo aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células Vero. Desta forma, os eventuais efeitos benéficos destas drogas não envolveriam diretamente a inibição ou diminuição da tempestade de citocinas.

Em relação à autofagia, um processo celular importante para a resposta antiviral, os efeitos dos medicamentos anti-hipertensivos ainda não estão claros. Embora a infecção pelo SARS-CoV-2 pareça aumentar a expressão de p62, um marcador de autofagia, o tratamento com losartan ou maleato de enalapril não parece alterar significativamente essa resposta. Outros marcadores e diferentes tipos celulares poderiam ser futuramente verificados para avaliar se autofagia não pode estar sendo modulada pela infecção viral.

Os resultados obtidos neste trabalho também sugerem que o losartan e o maleato de enalapril podem modular diferentemente os mecanismos celulares envolvidos na resposta à infecção pelo SARS-CoV-2. Embora o losartan tenha demonstrado uma redução significativa na infecção viral e não tenha afetado negativamente a expressão de genes inflamatórios, como IL-6 e IL-18, o maleato de enalapril parece ter efeitos variáveis na expressão desses genes. Como citado anteriormente, uma repercussão inflamatória diferente da obtida com os medicamentos utilizados cronicamente pode ser relevante em pacientes com condições predisponentes, tais como a infecção por SARS-CoV-2.

Esses achados ressaltam a importância de investigar mais a fundo o possível potencial desses medicamentos no tratamento da COVID-19 e entender melhor os mecanismos pelos quais eles influenciam a resposta celular ao vírus. A verificação dos efeitos de inibidores do SRAA como sendo complexos e distintos sobre as vias celulares envolvidas na resposta ao SARS-CoV-2, infelizmente revela que há muito a ser compreendido sobre seu papel na progressão e no resultado da COVID-19. Mais pesquisas são necessárias para determinar como esses medicamentos afetam diferentes tipos de células e como isso pode influenciar a evolução da doença em pacientes infectados.

6. Referências

- Albashir AAD. Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Inhibitors and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *South Med J*. 2021;114(1):51-56. doi:10.14423/SMJ.0000000000001200
- Augustine R, S A, Nayeem A, et al. Increased complications of COVID-19 in people with cardiovascular disease: Role of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) dysregulation. *Chem Biol Interact*. 2022;351:109738. doi:10.1016/j.cbi.2021.109738
- Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am*. 2019;33(4):891-905. doi:10.1016/j.idc.2019.08.001
- Aziz M, Fatima R, Assaly R. Elevated interleukin-6 and severe COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol*. 2020;92(11):2283-2285. doi:10.1002/jmv.25948
- Baral R, Tsampasian V, Debski M, et al. Association Between Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors and Clinical Outcomes in Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2021;4(3):e213594. 2021. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.3594
- Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(5):1106-1121. doi:10.1038/s41423-020-00630-3
- Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med*. 2020;27(2):taaa008. doi:10.1093/jtm/taaa008
- Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci*. 2021;11(1):136. doi:10.1186/s13578-021-00643-z
- Carey RM, Moran AE, Whelton PK. Treatment of Hypertension: A Review. *JAMA*. 2022;328(18):1849-1861. doi:10.1001/jama.2022.19590
- Chakraborty C, Bhattacharya M, Dhama K. SARS-CoV-2 Vaccines, Vaccine Development Technologies, and Significant Efforts in Vaccine Development during the Pandemic: The Lessons Learned Might Help to Fight against the Next Pandemic. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(3):682. 2023. doi:10.3390/vaccines11030682

- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9
- DeGrace MM, Ghedin E, Frieman MB, et al. Defining the risk of SARS-CoV-2 variants on immune protection. *Nature*. 2022;605(7911):640-652. doi:10.1038/s41586-022-04690-5
- Diarimalala RO, Wei Y, Hu D, Hu K. Inflammasomes during SARS-CoV-2 infection and development of their corresponding inhibitors. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1218039. 2023. doi:10.3389/fcimb.2023.1218039
- Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 2005;73(4):1907-1916. doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005
- Furuhashi M, Moniwa N, Mita T, et al. Urinary angiotensin-converting enzyme 2 in hypertensive patients may be increased by olmesartan, an angiotensin II receptor blocker. *Am J Hypertens*. 2015;28(1):15-21. doi:10.1093/ajh/hpu086
- Gorbalenya, AE, Baker, SC, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536-544. doi:10.1038/s41564-020-0695-z
- Goyal R, Gautam RK, Chopra H, et al. Comparative highlights on MERS-CoV, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, and NEO-CoV. *EXCLI J*. 2022;21:1245-1272. doi:10.17179/excli2022-5355
- Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*. 2020;7(1):11. 2020. doi:10.1186/s40779-020-00240-0
- Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshev V. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1716. 2022. doi:10.3390/ijms23031716
- Hahn WO, Wiley Z. COVID-19 Vaccines. *Infect Dis Clin North Am*. 2022;36(2):481-494. doi:10.1016/j.idc.2022.01.008
- Hassani B, Attar Z, Firouzabadi N. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) signaling pathways and cancer: foes versus allies. *Cancer Cell Int*. 2023;23(1):254. 2023 Oct 27. doi:10.1186/s12935-023-03080-9
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052

- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021;141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
- Huang Q, Zeng J, Yan J. COVID-19 mRNA vaccines. *J Genet Genomics*. 2021;48(2):107-114. doi:10.1016/j.jgg.2021.02.006
- Hui DS, Azhar EI, Memish ZA, Zumla A. Human Coronavirus Infections—Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS), and SARS-CoV-2. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. 2022;146-161. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11634-4
- Jin L, Li Z, Zhang X, Li J, Zhu F. CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2. *Hum Vaccin Immunother*. 2022;18(6):2096970. doi:10.1080/21645515.2022.2096970
- Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2016;42:63-71. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- Koči J, Novotová M, Sláviková M, Klempa B, Zahradník I. SARS-CoV-2 Exploits Non-Canonical Autophagic Processes to Replicate, Mature, and Egress the Infected Vero E6 Cells. *Pathogens*. 2022;11(12):1535. 2022 Dec 14. doi:10.3390/pathogens11121535
- Kung YA, Lee KM, Chiang HJ, Huang SY, Wu CJ, Shih SR. Molecular Virology of SARS-CoV-2 and Related Coronaviruses. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2022;86(2):e0002621. doi:10.1128/mmb.00026-21
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-331. doi:10.1016/s0092-8674(00)81871-1
- Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):767-777. doi:10.1038/nri2161
- Liang, S., Bao, C., Yang, Z. *et al*. SARS-CoV-2 spike protein induces IL-18-mediated cardiopulmonary inflammation via reduced mitophagy. *Sig Transduct Target Ther*. 2023; 8, (108). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01368-w>
- Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199-1207. doi:10.1056/NEJMoa2001316
- Lodi G, Gentili V, Casciano F, et al. Cell cycle block by p53 activation reduces SARS-CoV-2 release in infected alveolar basal epithelial A549-hACE2 cells. *Front Pharmacol*. 2022;13:1018761. 2022. doi:10.3389/fphar.2022.1018761

- Lui G, Guaraldi G. Drug treatment of COVID-19 infection. *Curr Opin Pulm Med*. 2023;29(3):174-183. doi:10.1097/MCP.0000000000000953
- Madhur MS, Eljovich F, Alexander MR, et al. Hypertension: Do Inflammation and Immunity Hold the Key to Solving this Epidemic. *Circ Res*. 2021;128(7):908-933. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318052
- Matsuzawa Y, Kimura K, Ogawa H, Tamura K. Impact of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors on COVID-19. *Hypertens Res*. 2022;45(7):1147-1153. doi:10.1038/s41440-022-00922-3
- Mills, KT, Stefanescu, A and He, J. The Global Epidemiology of Hypertension. *Nature Reviews Nephrology*,16,223-237. 2020. doi:10.1038/s41581-019-0244-2
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório aponta que número de adultos com hipertensão aumentou 3,7% em 15 anos no Brasil. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/maio/relatorio-aponta-que-numero-de-adultos-com-hipertensao-aumentou-3-7-em-15-anos-no-brasil>>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009;137(6):1001-1004. doi:10.1016/j.cell.2009.05.023
- Qu Y, Wang X, Zhu Y, et al. ORF3a-Mediated Incomplete Autophagy Facilitates Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Replication. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:716208. 2021. doi:10.3389/fcell.2021.716208
- Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(9):1015-1024. doi:10.1097/CM9.0000000000000722
- Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020;109:102433. doi:10.1016/j.jaut.2020.102433
- Santos CPC, Lagares LS, Santos SRM, et al. Association between Arterial Hypertension and Laboratory Markers, Body Composition, Obstructive Sleep Apnea and Autonomic Parameters in Obese Patients. *Arq Bras Cardiol*. 2023;120(7):e20220728. 2023. doi:10.36660/abc.20220728
- Sarkar M, Madabhavi I. SARS-CoV-2 variants of concern: a review. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2022;93(3):10.4081/monaldi.2022.2337. 2022. doi:10.4081/monaldi.2022.2337
- Schalk, A F, Hawn, M C. An Apparently New Respiratory Disease of Baby Chicks. J. Journal of the American Veterinary Medical Association (413-423). 1931. 19312200297

- Su, M et al. A Mini-Review on Cell Cycle Regulation of Coronavirus Infection. *Frontiers in Veterinary Science* Frontiers Media S.A., 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.586826
- Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016;24(6):490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003
- Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8
- Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res.* 2015;116(6):960-975. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303587
- Tsampsian V, Corballis N, Vassiliou VS. Renin-Angiotensin-Aldosterone Inhibitors and COVID-19 Infection. *Curr Hypertens Rep.* 2022;24(10):425-433. doi:10.1007/s11906-022-01207-3
- V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6
- Wang X, Liu Y, Li K, Hao Z. Roles of p53-Mediated Host-Virus Interaction in Coronavirus Infection. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6371. 2023. doi:10.3390/ijms24076371
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 11 fev. 2024.
- Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):26. 2022. doi:10.1038/s41392-022-00884-5
- Yuan Y, Jiao B, Qu L, Yang D, Liu R. The development of COVID-19 treatment. *Front Immunol.* 2023;14:1125246. 2023. doi:10.3389/fimmu.2023.1125246
- Zambalde ÉP, Dias TL, Maktura GC, et al. Increased mTOR Signaling and Impaired Autophagic Flux Are Hallmarks of SARS-CoV-2 Infection. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;45(1):327-336. 2022. doi:10.3390/cimb45010023
- Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol.* 2021;50:173-182. doi:10.1016/j.coviro.2021.08.010
- Zhao J, Cui W, Tian BP. The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. *Front Microbiol.* 2020;11:580137. 2020 Sep 30. doi:10.3389/fmicb.2020.580137
- Zhao MM, Yang WL, Yang FY, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug

development. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):134. 2021.
doi:10.1038/s41392-021-00558-8

Zhou, B. et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. 2022;399(10324):520. *Lancet.*2021;398(10304):957-980.doi:10.1016/S0140-6736(21)01330-1

Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;588(7836):E6.
doi:10.1038/s41586-020-2951-z



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3513
E-mail: propesq@pucrs.br
Site: www.pucrs.br