



**CENTRO UNIVERSITÁRIO FAMETRO
CURSO DE NUTRIÇÃO**

CÁSSIA TAIANE VIANA MORAES

**PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE BARREIRA NO TRATO
GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA
DE SARS-COV-2**

FORTALEZA

2022

CÁSSIA TAIANE VIANA MORAES

PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE BARREIRA NO TRATO
GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE
SARS-COV-2

Artigo TCC apresentado ao curso de Bacharel de Nutrição do Centro Universitário Fametro - UNIFAMETRO – como requisito para a obtenção do grau de bacharel, sob a orientação da Prof^ª Dra. Cristhyane Costa de Aquino.

FORTALEZA

2022

CÁSSIA TAIANE VIANA MORAES

PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE BARREIRA NO TRATO
GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE
SARS-COV-2

Artigo TCC apresentada no dia 15 de junho de 2022 como requisito para a obtenção do grau de bacharel em Nutrição do Centro Universitário Fametro - UNIFAMETRO – tendo sido aprovado pela banca examinadora composta pelos professores abaixo:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Cristhyane Costa de Aquino
Orientadora – Centro Universitário Fametro

Prof^a. M^a. Roberta Freitas Celedônio
Membro - Centro Universitário Fametro

Prof^a. M^a. Camila Pinheiro Pereira
Membro - Centro Universitário Fametro

A professora Cristhyane Costa, que com sua dedicação e cuidado de mestre, orientou-me na produção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida, por ter me ajudado a ultrapassar todos os desafios e ter me dado forças em todos os momentos. Por ser minha fortaleza e me amar incondicionalmente.

A minha família, minha mãe Tereza Viana, meus irmãos Cláudia Moraes, Cláudio Moraes, Kátia Moraes, Sandra Moraes, Andreia Moraes, Benedito Moraes, Hellen Silvana, Alexandre Moraes, Ângela Gésica, Francilene Moraes, Suellen de Fátima, Priscila Tanisy, Ary Moraes, Lethícia Moraes, Ana Paula Moraes, que sempre acreditaram em mim, em especial meu pai Acrísio Moraes e meu irmão José Adailton, que partiram desse plano deixando muitas saudades.

Agradeço ao meu noivo, Rômulo Vieira, por sempre estar ao meu lado me incentivando e mostrando que posso ir bem mais além. Ele que sempre me apoiou, teve paciência e foi um abrigo em meio a tantos problemas.

A minha orientadora Prof^ª Dra. Cristhyane Costa, que desde o início do curso sempre se mostrou muito prestativa em ajudar, aconselhar, me deu muitas oportunidades, me encheu de conhecimento. A ela todo meu respeito e admiração enquanto pessoa e profissional.

A Prof^ª Dra. Raquel Paim, por toda orientação, empatia e paciência. Aos meus amigos e colegas que o curso me deu, que sempre me apoiaram e me ouviram. Aos meus professores da UNIFAMETRO, que sempre torceram e sempre acreditaram no meu potencial.

Aos meus colegas de trabalho da empresa Riva Saúde Ambiental, e a todos que ao longo do curso depuseram confiança em mim.

Segundo a minha intensa expectativa e esperança, de que em nada serei confundido; antes, com toda confiança, Cristo será, tanto agora como sempre, engrandecido no meu corpo, seja pela vida, seja pela morte.

Filipenses 1:20

PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E DE BARREIRA NO TRATO
GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE
SARS-COV-2

Cássia Taiane Viana Moraes¹

Cristhyane Costa de Aquino²

RESUMO

Em dezembro de 2019 foi relatado pela primeira vez uma infecção viral de etiologia desconhecida, responsável por inúmeros casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província chinesa de Hubei. Em janeiro de 2020 foi identificado um novo coronavírus, marcando o início de uma nova pandemia, ocasionando impactos na saúde pública, meios sociais e econômicos. Suas consequências para à saúde humana e no funcionamento normal da sociedade são incomensuráveis. Embora o vírus seja em grande parte relacionado ao trato respiratório, estudos recentes demonstram o RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fezes de pacientes infectados e verificou-se que seu receptor (ECA2) era altamente expresso em células epiteliais gastrointestinais (esôfago, estômago, duodeno e reto), contribuindo para sintomas de náuseas, vômitos e diarreia, que geralmente pioram com a progressão da doença. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar o efeito da espícula do SARS-CoV-2 em parâmetros histopatológicos e de barreira em nível intestinal, observando os aspectos dos vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório *in vivo*. Foram utilizados camundongos C57BL/6 e BalbC albinos, machos, pesando entre 20-24g. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e uma laparotomia mediana foi realizada, foi feita uma incisão abdominal para expor o intestino delgado, as alças jejunais (2–3 cm) foram isoladas usando suturas e inoculadas com 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para o grupo controle, e a S1 ou S2 dissolvida em 95 µL de PBS na dose de 5 µg/alça para os grupos espícula S1 e S2. Após a inoculação foram observados os efeitos da proteína S no lúmen intestinal e a resposta inflamatória diante da exposição; na análise histológica foram observados o grau de severidade da inflamação. A partir da inoculação *in vivo* da espícula nas alças do intestino delgado, observou-se um aumento do peso úmido e secreção de cloreto no fluido intestinal. A análise histopatológica mostrou que a proteína *spike* induziu células inflamatórias, hemorragia e edema da mucosa. Observou-se uma redução na expressão de ocludina após inoculação da glicoproteína. Este estudo evidenciou alterações em nível intestinal que corroboram para o surgimento de sintomas gastrointestinais. Porém, se faz necessário que mais estudos sejam realizados, afim de explorar os mecanismos do intestino a partir da infecção.

Palavras-chave: COVID-19. Imunidade. Inflamação. Trato gastrointestinal. Proteína Spike.

¹ Graduanda do curso de Nutrição pelo Centro Universitário Fametro – UNIFAMETRO.

² Prof^ª. Orientadora do curso de Nutrição do Centro Universitário Fametro – UNIFAMETRO.

ABSTRACT

In december 2019, a viral infection of unknown etiology was reported for the first time, responsible for numerous cases of pneumonia in the city of Wuhan, China's Hubei province. In January 2020, a new coronavirus was identified, marking the beginning of a new pandemic, causing impacts on public health, social and economic environments. Its consequences for human health and the normal functioning of society are immeasurable. Although the virus is largely related to the respiratory tract, recent studies demonstrate SARS-CoV-2 RNA in stool samples from infected patients and its receptor (ACE2) was found to be highly expressed in gastrointestinal epithelial cells (esophagus, stomach, duodenum, and rectum), contributing to symptoms of nausea, vomiting, and diarrhea, which often worsen with disease progression. The main objective of the present study is to evaluate the effect of the SARS-CoV-2 spike on histopathological and barrier parameters at the intestinal level, observing the aspects of the villi and crypts, as well as the presence and intensity of the inflammatory infiltrate in vivo. Male albino C57BL/6 and BalbC mice weighing between 20-24g were used. Mice were anesthetized intraperitoneally with a combination of xylazine hydrochloride (5 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg) and a midline laparotomy was performed, an abdominal incision was made to expose the small intestine, jejunal loops (2– 3 cm) were isolated using sutures and inoculated with 100 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) for the control group, and S1 or S2 dissolved in 95 μ L of PBS at a dose of 5 μ g/loop for the S1 and S1 spike groups. S2. After inoculation, the effects of protein S in the intestinal lumen and the inflammatory response to exposure were observed; in the histological analysis, the degree of severity of the inflammation was observed. From the in vivo inoculation of the spike in the small intestine loops, an increase in wet weight and chloride secretion in the intestinal fluid were observed. Histopathological analysis showed that the spike protein induced inflammatory cells, hemorrhage and mucosal edema. A reduction in occludin expression was observed after inoculation of the glycoprotein. This study showed changes at the intestinal level that corroborate the emergence of gastrointestinal symptoms. However, it is necessary that more studies are carried out in order to explore the mechanisms of the intestine from the infection.

Keywords: COVID-19. Immunity. Inflammation. Gastrointestinal tract. Spike protein.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 METODOLOGIA	10
2.1 Avaliação da espícula de SARS-CoV-2 na resposta inflamatória intestinal	12
2.1.1 Análise histopatológica do intestino delgado:	12
2.2 Análise estatística	12
3 RESULTADOS	13
3.1 Análise macroscópica após inoculação da proteína <i>spike</i> do SARS-CoV-2.....	13
3.2 Peso úmido e dosagem de cloreto (Cl)	13
3.3 Avaliação das alterações histológicas após inoculação da proteína <i>spike</i>	14
3.4 Análise Western Blot: avaliação da ocludina após inoculação da proteína <i>spike</i>	15
4 DISCUSSÃO	16
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	18
REFERÊNCIAS	19

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, vários pacientes com pneumonia viral foram associados epidemiologicamente ao mercado de frutos do mar Huanan em Wuhan, na província de Hubei, na China. Um novo coronavírus com infecção humana, provisoriamente chamado de novo coronavírus 2019 (2019-nCoV) e desde então denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), foi identificado pelo sequenciamento genômico (LU *et al.*, 2020). Segundo o Ministério da Saúde (2021), o vírus ocasiona uma infecção respiratória potencialmente grave, com grande transmissibilidade e distribuição global.

Até a presente data, em meados de junho de 2022, existem mais de 530 milhões de casos de infecção confirmados no mundo, com mais de 6 milhões de mortes até o momento (OMS, 2022). Segundo o DATASUS, no Brasil, o número de óbitos chega a mais de 660 mil (BRASIL, 2022).

O coronavírus invade a célula por meio da endocitose mediada por clatrina. Durante o processo, proteínas *spike* (S) presentes na superfície do vírus reconhecem e se ligam às células hospedeiras. No entanto, na COVID-19 são utilizados os receptores da enzima conversora de angiotensina II (ECA2) para ligar-se às células, iniciando a infecção viral nos pneumócitos do tipo II no pulmão humano. A infecção por SARS-CoV-2 é atribuída a uma hiperativação das células T, aumento considerável de células Th17 e contagem mais alta, e citotoxicidade de células T CD8 (KHAN *et al.*, 2021). Nas formas graves da COVID-19, tais alterações ocasionam um processo inflamatório com liberação de citocinas aumentando os níveis de interleucina-2 (IL-2), interleucina-7 (IL-7), interleucina-10 (IL-10) fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína quimiotática de monócitos (MCP) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), associadas a uma importante progressão da doença (MENDES *et al.*, 2020).

Embora a COVID-19 seja em grande parte relacionada ao trato respiratório, dados recentes demonstram que o SARS-CoV-2 pode infectar outros sistemas e um grande número de órgãos vitais além dos pulmões, como os rins, o coração e cérebro (MAHALAKSHMI *et al.*, 2020). Inúmeros casos demonstram manifestações gastrointestinais, apresentando sintomas como diarreia, náuseas, vômitos e dores abdominais. Estudos mostraram que o RNA do SARS-CoV-2 foi detectado nas fezes por até um mês de 83,3% dos pacientes com infecção leve, levantando a suspeita de que o trato gastrointestinal seria um possível local para replicação viral (PATEL *et al.*, 2020).

A ECA2 é expressa principalmente em células epiteliais alveolares do tipo 2. Porém, há uma grande expressão da enzima na borda em escova dos enterócitos intestinais (LAMERS *et al.*, 2020). O vírus já foi identificado nas células epiteliais de superfície do estômago, intestino delgado e cólon, contribuindo para sintomas gastrointestinais que geralmente pioram com a progressão da doença. Foi verificada a presença da proteína do nucleocapsídeo viral em quase todo trato digestório de pacientes com COVID-19. Dados histológicos demonstram o epitélio do estômago, duodeno e reto com infiltração linfocitária irregular e edema intersticial, relacionando o SARS-CoV-2 e sintomas digestivos através de invasão viral em células-alvo, e/ou tecido imunomediado e lesão de órgão-alvo (GALANOPOULOS *et al.*, 2020).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar os efeitos da espícula do SARS-CoV-2 em parâmetros histopatológicos e inflamatórios na mucosa intestinal de camundongos, podendo servir como modelo experimental para outros estudos envolvendo o vírus e trato gastrointestinal.

2 METODOLOGIA

Para o estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 e BalbC albinos machos pesando entre 20-24g, em conformidade com as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (CEUA-NPDM) número 19110820-0. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, bem como o número de animais utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas microisoladoras, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, sendo oferecidas ração e água *ad libitum*. Os grupos experimentais consistiram de 5 a 8 animais por grupo e antes dos experimentos os animais foram submetidos a jejum de 18 a 24 horas, mas com livre acesso ao consumo de água. Os animais foram eutanasiados após anestesia com sobredose de cetamina-xilazina. No modelo de camundongo C57BL/6 foram avaliados os efeitos morfofuncionais e inflamatórios. Os camundongos BalbC foram utilizados para responder à pergunta sobre o efeito da espícula em animais com padrão de resposta Th2.

Todos os outros produtos químicos utilizados tiveram grau analítico e foram obtidos de fornecedores comerciais padrão. Todas as substâncias e medicamentos foram dissolvidos em solução salina ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). As glicoproteínas S1 e S2

da espícula do vírus SARS-CoV-2 foi obtida da *The Native Antigen Company* (Kidlington, Oxfordshire, UK).

A indução da espícula do SARS-CoV2 não envolveu microrganismo vivo ou geneticamente modificado e também não foi utilizado material genético isolado, bem como de outros componentes do vírus SARS-CoV-2 isolados. Não foram utilizadas amostras contaminadas com o vírus SARS-CoV2 e nem tampouco foi feito cultivo viral. No nosso estudo foram utilizadas apenas glicoproteínas *spike* (ou espícula) recombinante do SARS-CoV-2, obtidas do *The Native Antigen Fabricant*, que no seu “*Data Sheet*”, assegura que a substância não oferece riscos de contaminação e não gera resíduos perigosos. O uso de EPIs e capela de fluxo laminar oferece a segurança necessária para a manipulação do material e injeção dos camundongos.

Os animais tiveram acesso à água, mas não a alimento por 24 horas antes do experimento. Os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e uma laparotomia mediana foi realizada, sendo feita uma incisão abdominal para expor o intestino delgado, onde alças jejunais (2–3 cm) foram isoladas usando suturas. Neste procedimento, a temperatura corporal foi mantida durante a cirurgia a 36–38 °C usando uma almofada de aquecimento. As alças intestinais foram inoculadas com 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para o grupo controle, e a S1 ou S2 dissolvida em 95 µL de PBS na dose de 5 µg/alça para os grupos espícula S1 e S2. A incisão abdominal foi fechada utilizando suturas e os animais foram devidamente acondicionados para recuperação da anestesia. Após 4 horas, os camundongos foram eutanasiados e as alças foram rapidamente removidas da cavidade abdominal. A secreção de fluido foi medida indiretamente como a razão de peso/comprimento da alça expressa em g/cm.

Das alças intestinais foi retirado o conteúdo acumulado separadamente, para centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e diluído de 1:2 com água destilada, misturadas com os reagentes de acordo com as instruções do fabricante (Labtest®, SP, Brasil) por dois minutos para medir a concentração de íons cloreto (Cl⁻). Após esse processo, a amostra teve sua absorbância aferida a 470 nm em espectrofotômetro, com valores expressos em mEq/L.

2.1 Avaliação da espícula de SARS-CoV-2 na resposta inflamatória intestinal

O mesmo procedimento de inoculação das espículas virais de SARS-CoV-2, como descrito previamente, ocorreu para a realização desta etapa do projeto. As alças intestinais foram retiradas para cortes histológicos, bem como amostras que foram mensuradas a atividade da mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (BADLEY *et al.*, 1982).

2.1.1 Análise histopatológica do intestino delgado:

Após o sacrifício dos animais por sobredose anestésica, foi removido um segmento de 0,5 cm do jejuno do camundongo. Em seguida, essas amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 400x (Microscópio Nikon com objetiva 40x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x). A análise histopatológica envolveu a observação do aspecto dos vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório.

2.2 Análise de Western Blotting

O tecido coletado (jejuno) foi processado para Western Blotting de acordo com procedimentos padrão. Resumidamente, o tecido foi homogeneizado em tampão de lise (cloreto de sódio 0,15 M, base Tris 0,05 M, ácido etilenoglicol-tetracico 0,005 M, 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% SDS e 1% X-Triton, pH 7,5) suplementado com inibidores de protease (Roche Applied Sciences). O nível total de proteína foi quantificado usando o método do ácido bicinonínico (BCA; Pierce) e armazenado a -20 °C até uso posterior. Em seguida, as amostras processadas foram colocadas em banho-maria (a 95 °C) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M a 10,4% SDS pH 6,8) durante 5 min. Diferentes concentrações de amostra, contendo proteínas específicas, foram analisadas. Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (10% e 12%), corrida a 130 V. Em seguida, as proteínas da amostra foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore) por 1 h 30 min a 110 V. bloqueio com BSA (5%), as amostras foram incubadas com anticorpos primários (anti-occludina de coelho; 1: 200, Santa Cruz Biotechnology), durante a noite, a 4° C por incubação com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina IgG anti-cabra (1: 10.000, GE Healthcare), 1h em temperatura (ambiente). O controle interno para o nível de proteína em

cada amostra foi avaliada por anti- β -actina de camundongo (1:10.000, Sigma-Aldrich). Bandas proteicas alvo foram visualizadas após incubação com membrana com quimiofluorescência aumentada (ECF, Amersham) usando um Typhoon FLA 9000 (GE-Healthcare Biosciences) e quantificadas usando o *software Image Studio* (versão 5.2, Licor).

2.3 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados no software *Graphpad Prism* (versão 5.0). A significância estatística das diferenças entre os grupos foi determinada por análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida do teste de *Student-Newman-Keuls*. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Análise macroscópica após inoculação da proteína *spike* do SARS-CoV-2

O modelo de indução da espícula nos camundongos mostrou ocasionar distúrbios inflamatórios e um aumento do volume nas alças intestinais nas duas linhagens, quando comparados ao grupo PBS (Figura 1).

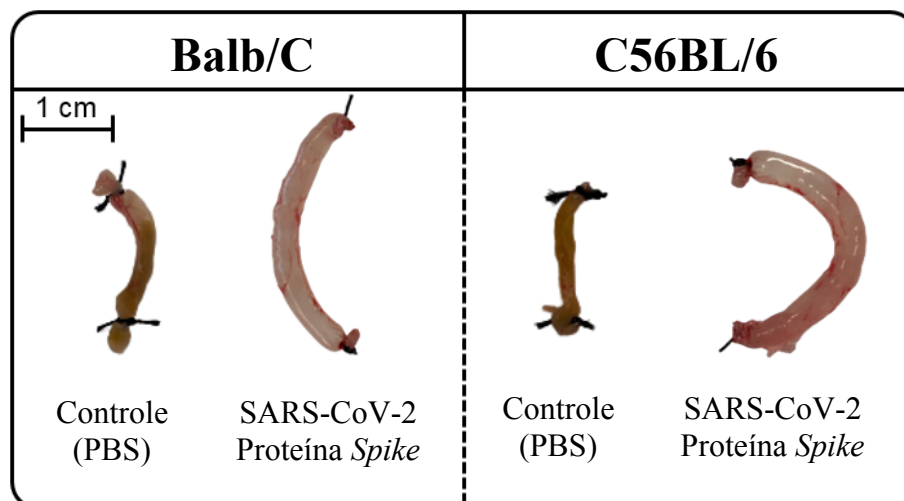


Figura 1 – Imagens de macroscopia do intestino, capturadas em BalbC e C57BL6 após inoculação da proteína *spike* do SARS-CoV-2 na alça do intestino delgado
Fonte: elaborado pelas autoras.

3.2 Peso úmido e dosagem de cloreto (Cl)

A inoculação da espícula do SARS-CoV-2 nos camundongos, aumentou o peso úmido nas diferentes linhagens quando comparados ao grupo controle (Figura 2 – A e B). Após indução da proteína *spike* observou-se uma maior tendência no aumento do teor de cloreto na linhagem Balb/C, enquanto na linhagem C57BL/6 observou-se um aumento significativo no teor de cloreto (Figura 2 – C e D).

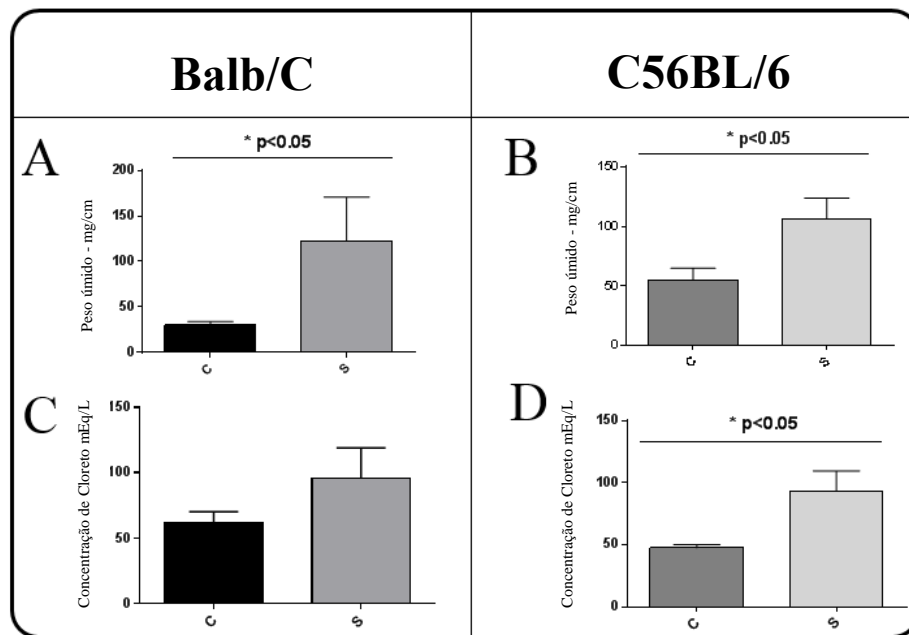


Figura 2 - Peso úmido (A e B) e dosagem de cloreto (C e D) em Balb/C e C57BL/6 após inoculação da proteína *spike*
 C: controle; S: proteína *spike*
 Fonte: elaborado pelas autoras.

3.3 Avaliação das alterações histopatológicas após inoculação da proteína *spike*

As análises histopatológicas foram feitas qualitativamente, na linhagem Balb/C foram identificados pontos hemorrágicos e infiltrado inflamatório com ativação de células neutrofílicas no epitélio da mucosa intestinal quando comparados ao grupo controle (PBS 100 μ L). Na linhagem C57BL/6 foram identificados marcadores sugestivos de apoptose e formação de vesículas, presença de células inflamatórias, neutrófilo intraepiteliais além de vacuolizações indicando o potencial efeito da proteína *spike* na (Figura 3).

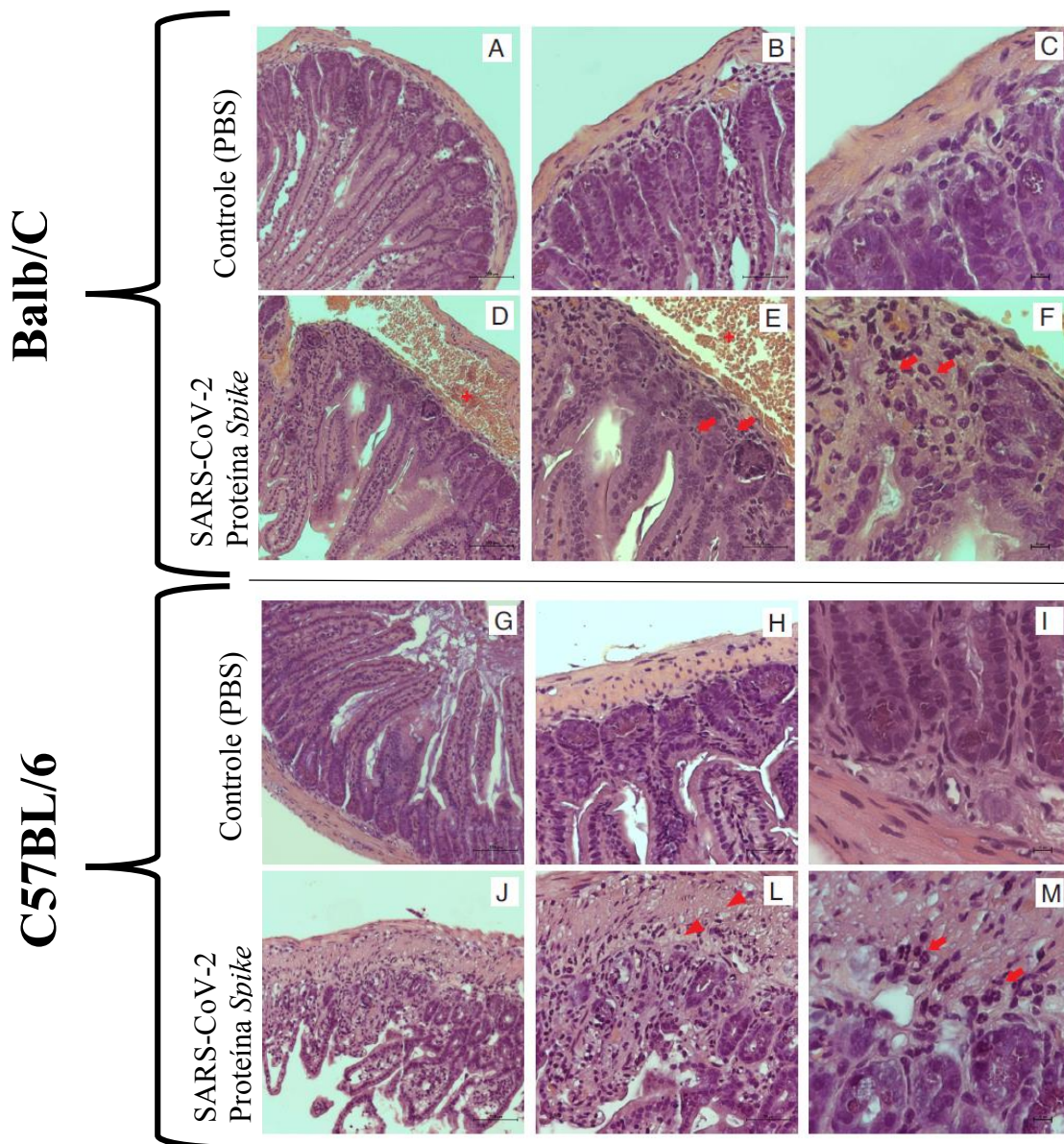


Figura 3 - Análise histopatológica das linhagens Balb/C e C57BL/6
 PBS – Solução salina tamponada com fosfato
 Fonte: elaborado pelas autoras.

3.4 Análise Western Blotting: avaliação da ocludina após inoculação da proteína *spike*

Após inoculação com a proteína *spike*, foi observada uma diminuição significativa de ocludina ($p < 0,02$ para Balb/C e $p < 0,04$ para C57BL/6), sugerindo que a glicoproteína do SARS-CoV-2 pode potencializar respostas inflamatórias e quadros diarreicos (Figura 4).

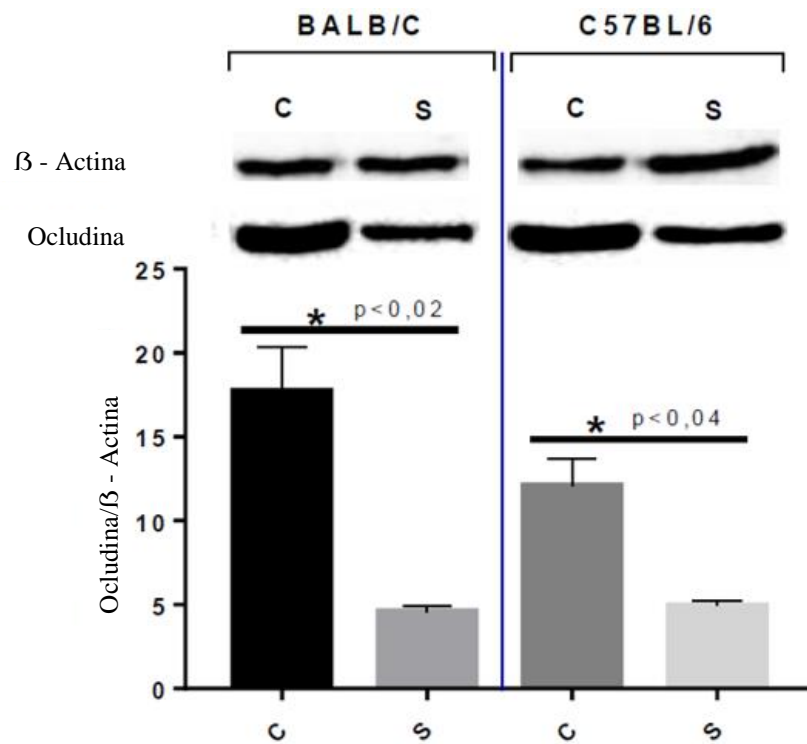


Figura 4 - Expressão de ocludina por Western Blot em Balb/C e C57BL/6 após inoculação da proteína spike do SARS-CoV-2 na alça do intestino delgado
C: Controle; S: proteína spike
Fonte: elaborado pelas autoras

4 DISCUSSÃO

Pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 podem apresentar distúrbios eletrolíticos que acabam tendo implicações no manejo e nos mecanismos fisiopatológicos da doença (LIPPI; SUL, 2020). Estudos apontam que a diarreia pode ser resultado de uma desregulação eletrolítica, levando à alterações da mucosa e das respostas imunes locais aumentando a permeabilidade intestinal gerando disfunção nos enterócitos (TROISI *et al.*, 2021). Após indução da glicoproteína, foi observado neste estudo, um aumento significativo no teor de íons cloreto na linhagem C57BL/6, sem efeito significativo na linhagem Balb/C. Em ambos os grupos S, foi verificado um aumento no peso úmido quando comparados ao grupo controle.

Os estudos evidenciam que o sistema imune acaba tendo uma resposta perturbada após infecção por SARS-CoV-2, sendo caracterizada por uma hiperativação das células T, com liberação de citocinas e quimiocinas (BARHOUMI *et al.*, 2021). Modulada por mediadores pró-inflamatórios, a apoptose celular é uma das consequências do processo infeccioso, corroborando para aos piores desfechos da COVID-19 (TLILI *et al.*, 2021). De acordo com tal observação o presente estudo evidencia que a estimulação com a proteína *spike* do COVID-19,

desencadeia um conjunto de eventos associados há um aumento do infiltrado inflamatório. De acordo com a análise histopatológica, foram identificados pontos hemorrágicos, edema, assim como um aumento de neutrófilo na mucosa intestinal em camundongos Balb/C, quando comparados ao grupo controle. No grupo C57BL/6 foram encontrados marcadores de apoptose, presença de neutrófilos, células pró-inflamatórias e vacuolizações após estimulação com a proteína *spike*. Cho *et al.* (2021), estudaram os achados histopatológicos de pacientes do sexo masculino com média de idade de 65 anos. Os pacientes apresentaram sangramento na parte inferior do TGI, o que foi associado a uma isquemia e hipoperfusão que podem ser desencadeadas pela tempestade de citocinas ocasionada pela infecção viral, que leva a um perfil anormal de coagulação sanguínea.

Já é bem estabelecido que o intestino é um local importante da regulação do sistema imune. O tecido linfoide associado ao intestino (GALT), formado principalmente pelas placas de Payer e nódulos linfáticos mesentéricos, são sítios com robusta importância na indução da resposta imune a patógenos, enquanto que o epitélio e lâmina própria são regiões efetoras dessa resposta (AHLUWALIA *et al.*, 2017). No contexto da COVID-19, sendo o intestino local de manifestação da doença e também porta de entrada do SARS-CoV-2, possuindo alta expressão de ECA2 e alta carga viral em infecções agudas, a apresentação de antígenos virais possivelmente desencadeia uma resposta imune dependente de linfócitos T (TROISI *et al.*, 2021).

Segundo Velikova *et al.* (2021), a infecção por SARS-CoV-2 ocasiona uma perda da integridade intestinal e disfunção da microbiota local. Uma ruptura na integridade da barreira, vai ativar células imunológicas, que por sua vez vão liberar citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea, acarretando um processo de inflamação sistêmica. A ocludina é uma proteína de suma importância para as junções oclusivas do intestino. Quando há um dano ao tecido, a expressão desta proteína acaba sendo reduzida, estando associada a eventos como translocação bacteriana, aumento da permeabilidade intestinal, que pode ser visto em algumas doenças intestinais, envolvendo quadros inflamatórios e diarreia (RAWAT *et al.*, 2020). A partir deste estudo, a inoculação da proteína *spike* reduziu os níveis de expressão da ocludina. Ademais, foi visto que esta diminuição alterou a permeabilidade e integridade da barreira, potencializando respostas inflamatórias e quadros diarreicos.

Sintoma pouco destacado pela literatura até pouco tempo em indivíduos infectados com o SARS-CoV-2, a diarreia chega a acometer entre 10-30% dos pacientes em estudos publicados na renomada revista *Gut*, que traz como título (traduzido): “A diarreia pode estar

subestimada: falta de conexão com o novo coronavírus 2019”. Nesse estudo, Liang *et al.* (2020), verificaram uma alta expressão de ECA2 em enterócitos do intestino delgado de pacientes. A literatura mostra que o receptor viral do SARS-CoV-2 (ECA2) controla a inflamação intestinal, especialmente da deficiência desta enzima. Portanto, a interação mútua entre SARS-Cov-2 e ECA2 pode atrapalhar a função da enzima e resultar em diarreia (LIANG *et al.*, 2020).

Adicionalmente, neste estudo, foi evidenciado a interação da espícula do SARS-CoV-2 e o TGI, ocasionando alterações histológicas, aumento do volume tecidual das alças intestinais, alteração na permeabilidade intestinal a partir da redução de ocludina. Estes achados podem estar relacionados com os sintomas gastrointestinais, principalmente a diarreia. Em uma meta-análise com 25.252 estudos, Elshazli *et al.* (2020), mostraram que os sintomas gastrointestinais estavam presentes em pelo menos um quinto da população estudada, associados à altas taxas de desfechos adversos, como internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e mortalidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cenário ocasionado pela COVID-19 ainda é muito complexo. Os desfechos da doença ainda não estão totalmente elucidados. É certo que a infecção ocasiona diversos efeitos em diferentes sistemas e órgãos, inclusive no trato gastrointestinal, sendo este associado a sintomas como diarreia, náuseas, vômitos e dor abdominal. Este estudo evidenciou alterações em nível intestinal que corroboram com esses achados. O TGI tem se mostrado não apenas como um reservatório do SARS-CoV-2, mas também um importante campo de batalha entre vírus e sistema imune. Foi demonstrado que a inoculação da espícula do SARS-CoV-2 ocasiona aumento do infiltrado inflamatório em modelos de camundongos e alteração da permeabilidade da barreira. Porém, se faz necessário que mais estudos sejam realizados, afim de explorar os mecanismos do intestino a partir da infecção, bem como investigar como a diarreia afeta os pacientes infectados com COVID-19, e como os sintomas gastrointestinais refletem no prognóstico desses pacientes. Sendo estes relevantes para um melhor direcionamento e tratamento da doença.

REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, B.; MAGNUSSON, M. K.; ÖHMAN, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 52, n. 11, p. 1185-1193, Jul. 2017.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, Sep. 1982.
- BARHOUMI *et al.* SARS-CoV-2 coronavirus spike protein-induced apoptosis, inflammatory, and oxidative stress responses in THP-1-like-macrophages: Potential role of angiotensin-converting enzyme inhibitor (perindopril). **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coronavírus Brasil. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Painel Coronavírus**. [Brasília, DF]: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 02 jun. 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. O que é COVID-19?. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#o-que-e-covid>. Acesso em 10 de mar. 2022.
- CHO *et al.* Clinical and intestinal histopathological findings in SARS-CoV-2/COVID-19 patients with hematochezia. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 15, n. 1, p. 408-417, 2021.
- ELSHAZLI *et al.* Gastroenterology manifestations and COVID-19 outcomes: A meta-analysis of 25,252 cohorts among the first and second waves. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 5, p. 2740-2768, 2021.
- GALANOPOULOS, M. *et al.* COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. **World journal of gastroenterology**, v. 26, n. 31, p. 4579, Aug. 2020.
- KHAN *et al.* COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 39, Dec. 2021.
- LAMERS, M. M. *et al.* SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. **Science**, v. 369, n. 6499, p. 50-54, Jul. 2020.
- LIANG, W. *et al.* Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. **Gut**, v. 69, n. 6, p. 1141-1143, Jun. 2020.
- LIPPI, Giuseppe; SOUTH, Andrew M.; HENRY, Brandon Michael. Electrolyte imbalances in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Annals of clinical biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 262-265, 2020.
- LU, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, Feb. 2020.

MAHALAKSHMI *et al.* Does COVID-19 contribute to development of neurological disease?. **Immunity, inflammation and disease**, v. 9, n. 1, p. 48-58, Oct. 2020.

MENDES *et al.* COVID-19 & SARS. **Ulakes Journal of Medicine**, v. 1, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. COVID-19 Data Explorer. In: ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Daily new confirmed COVID-19**. Organização Mundial da Saúde, 2022. Disponível em: <https://ourworldindata.org/explorers/coronavirus-data-explorer>. Acesso em: 02 jun. 2022.

PATEL *et al.* Gastrointestinal, hepatobiliary, and pancreatic manifestations of COVID-19. **Journal of Clinical Virology**, v. 128, p. 104386, Apr. 2020.

RAWAT *et al.* IL1B increases intestinal tight junction permeability by up-regulation of MIR200C-3p, which degrades occludin mRNA. **Gastroenterology**, v. 159, n. 4, p. 1375-1389, 2020.

TROISI *et al.* COVID-19 and the gastrointestinal tract: Source of infection or merely a target of the inflammatory process following SARS-CoV-2 infection?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 14, p. 1406, 2021.

VELIKOVA *et al.* Gastrointestinal mucosal immunity and COVID-19. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 30, p. 5047, 2021.