



**CENTRO UNIVERSITÁRIO FAMETRO  
NUTRIÇÃO**

**NATHÁLIA ALINE PEREIRA DE SOUZA**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE  
CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE SARS-COV-2.**

**FORTALEZA**

**2021**

NATHÁLIA ALINE PEREIRA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE  
CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE SARS-COV-2.**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Graduação em Nutrição do Centro Universitário Fametro – UNIFAMETRO, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristhyane Costa de Aquino.

FORTALEZA

2021

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE  
CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE SARS-COV-2.

Artigo apresentado no dia 10 de dezembro de 2021 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<sup>o</sup>. Dr. Cristhyane Costa de Aquino  
Orientador – Centro Universitário Fametro

---

Prof<sup>a</sup>. Ms Isabela Gomes Limaverde  
Membro - Centro Universitário Fametro

---

Prof<sup>o</sup>. Ms Cássia Rodrigues Roque  
Membro – Universidade Federal do Ceará

## AGRADECIMENTOS

Agradeço este trabalho primeiramente a **Deus**, em que a todo o momento se fez presente me permitindo chegar até aqui mais forte e mais humana, por ouvir minhas orações e desejos do meu coração com todo amor, justiça e bondade.

Agradeço ao meus pais Eliedna Pereira e José Constantino, que são minhas maiores inspirações de vida, por sempre terem acreditado em mim, no meu potencial, por sempre estarem presentes em todos os momentos e por não medirem esforços para a minha felicidade.

As minhas irmãs Jéssica e Karla por sempre me apoiarem e me incentivarem com todo amor, ao meu sobrinho Jean por ser minha dose diária de alegria.

Agradeço ao meu noivo Júnior Vale por todo amor, compreensão e apoio imenso na busca dos meus sonhos, se fazendo presente em todos os momentos.

Aos meus familiares que de alguma forma estiveram presentes, na torcida, com todo apoio, confiança e amor dedicados a mim nessa jornada.

Agradeço a minha orientadora Prof<sup>o</sup> Dra Cristhyane Costa pela diferença que fez na minha vida acadêmica, por todo seu apoio, disponibilidade, confiança e por ser exemplo como pessoa e profissional. Agradeço também a minha co-orientadora Prof<sup>o</sup> Dra. Raquel Paim, por sua ajuda, empenho e esforço para a realização deste projeto.

Agradeço as minhas amigas do curso de Nutrição que compartilharam comigo vários momentos inesquecíveis desde o início da graduação, que enfrentaram comigo todos os momentos e que se tornaram amigas para toda a vida.

Aos professores da UNIFAMETRO por todos os ensinamentos enriquecedores, pela grande competência e por me proporcionarem sabedoria pessoal e profissional que contribui de forma direta e indireta para o meu crescimento acadêmico.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.

Josué 1:9

# ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO TRATO GASTROINTESTINAL DE CAMUNDONGOS APÓS INOCULAÇÃO DE ESPÍCULA DE SARS-COV-2.

Nathália Aline Pereira De Souza<sup>1</sup>

Cristhyane Costa de Aquino<sup>2</sup>

## Resumo

A COVID 19, identificada em 2019 na China, foi a responsável pela atual pandemia que gerou grande preocupação mundial, visto que a doença se propagou de maneira descontrolada, apresentando diversas formas de ação, tornando-se assim um desafio para toda comunidade científica e médica. O conhecimento sobre a fisiopatologia do SARS- CoV-2 ainda é escasso, necessitando desse modo, de bastante cautela. Quanto ao que já se sabe, o vírus da COVID-19 entra nas vias respiratórias, chegando aos alvéolos, este tendo grande afinidade pelas células epiteliais respiratórias, o vírus se liga aos pneumócitos tipo 2, que produzem proteínas, onde reduzem a tensão superficial dos alvéolos e as aderem pela proteína S *Spike* ou espícula. A entrada do vírus acontece por meio da fusão de enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) e a proteína S, liberando o seu RNA dentro da célula. A COVID-19 varia entre aspectos clínicos de infecções assintomáticas a quadros mais graves e além de afetar o sistema respiratório, a doença também pode atingir outros sistemas, como o cardiovascular, neurológico, circulatório, renal, assim como o sistema digestório, ou seja, órgãos do trato gastrintestinal (TGI). Em se tratando do TGI, em torno de 1/3 dos pacientes apresentam sintomas de diarreia no decorrer da doença. Refletindo-se nos achados relacionados com à COVID-19, a proteína S *Spike* viral, ao se ligar à ECA2, propicia uma *downregulation* na expressão desta enzima que alcança sintomas geralmente associados a doenças que possui este receptor como protetor da homeostase. O presente estudo objetiva verificar as possíveis alterações morfológicas no trato gastrointestinal de camundongos após inoculação de espícula de sars-cov-2, através da certificação da atividade da proteína S em parâmetros morfofuncionais citados anteriormente. Por meio desse estudo, busca-se entender melhor os eventos morfológicos no TGI associados a COVID-19

---

<sup>1</sup> Graduando em nutrição pela UNIFAMETRO. E-mail: nathalia.souza@aluno.unifametro.edu.br

<sup>2</sup> Doutora em ciências médicas. E-mail: cristhyane.aquino@professor.unifametro.edu.br

para ambientes de estudos investigativos que possuam intuito de mitigar os danos causados pela infecção de SARS-CoV-2 utilizando o TGI.

**Palavras-chaves:** COVID-19; morfologia; SARS-COV2; intestino.

### **Abstract**

COVID 19, identified in 2019 in China, was responsible for the current pandemic that has generated great concern worldwide, as the disease has spread in an uncontrolled manner, presenting various forms of action, thus becoming a challenge for the entire scientific and medical community . Knowledge about the pathophysiology of SARS-CoV-2 is still scarce, thus requiring great caution. As for what is already known, the COVID-19 virus enters the airways, reaching the alveoli, which has great affinity for respiratory epithelial cells, the virus binds to type 2 pneumocytes, which produce proteins, where they reduce the surface tension of the alveoli and adhere to them by the protein S Spike or spike. Virus entry occurs through the fusion of type 2 angiotensin-converting enzyme (ACE2) and protein S, releasing its RNA into the cell. COVID-19 varies from clinical aspects of asymptomatic infections to more severe conditions and, in addition to affecting the respiratory system, the disease can also affect other systems, such as the cardiovascular, neurological, circulatory, renal, as well as the digestive system, that is, organs of the gastrointestinal tract (GIT). With regard to GIT, around 1/3 of patients present symptoms of diarrhea during the course of the disease. Reflecting on findings related to COVID-19, the viral protein S Spike, when binding to ACE2, provides a downregulation in the expression of this enzyme that reaches symptoms usually associated with diseases that have this receptor as a homeostasis protector. The present study aims to verify the possible morphological changes in the gastrointestinal tract of mice after inoculation of a sars-cov-2 spike, through the certification of protein S activity in morphofunctional parameters mentioned above. Through this study, we seek to better understand the morphological events in TGI associated with COVID-19 for investigative study environments that aim to mitigate the damage caused by SARS-CoV-2 infection using TGI.

**Keywords:** COVID-19; morphology ; SARS-COV-2; intestine.

## Introdução

De acordo com o Ministério da Saúde (2020), a COVID-19 consiste em uma patologia provocada pelo novo coronavírus, nomeados de SARS–Cov-2, sendo identificados em dezembro de 2019, em Wuhan, na China. A doença foi disseminada por vários países transmitindo de pessoa a pessoa. A COVID-19 pode variar entre aspectos clínicos de infecções assintomáticas a até apresentar quadros mais graves, em torno de 80% dos indivíduos acometidos pela doença são assintomáticos ou manifestam poucos sintomas, outros, cerca de 20%, apresentam necessidade de atendimento hospitalar. Os sintomas podem variar entre um resfriado até uma pneumonia mais grave e os principais sintomas: tosse, febre, anosmia, ageusia, dificuldades para respirar, cansaço, dispneia, entre outros (BRASIL, 2020). Porém, estudos apontam que os pacientes podem também apresentar sintomas associados com o trato gastrintestinal (TGI), como náusea, vômitos, diarreia e dor abdominal, assim como apresentar o vírus em células epiteliais do TGI e de seu RNA nas fezes (XIAO F, *et al*, 2020; DING S, LIANG TJ, 2020).

O vírus da COVID-19, utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) como receptor para adentrar nas células, infectando principalmente as células dos pulmões, mas pode também acometer o tecido gastrintestinal, pois também possui os receptores ECA2 na borda em escova da mucosa intestinal (XIAO F, *et al*, 2020).

A patogênese da associação do SARS-CoV-2 com o trato gastrointestinal ainda é limitada e provavelmente multifatorial. Diversas hipóteses foram relatadas até agora, inclusive a citotoxicidade viral correlacionada com a ACE 2 direta da mucosa intestinal, inflamação induzida por citocinas, disbiose intestinal e anormalidades vasculares. Diversos estudos apontam também que a infecção intestinal com SARS-CoV-2 provoca alterações da microbiota fecal que podem ocasionar danos aos enterócitos, repercutindo em sintomas clínicos de diarreia (ALEEM A, SHAH H, 2021).

Dessa forma, acredita-se que os pacientes acometidos pela COVID-19, tenham risco de apresentar alterações morfológicas acerca do envolvimento da infecção pelo SARS-CoV-2 com o trato gastrintestinais (TGI), indicando uma implicação direta da disbiose intestinal na COVID-19. Portanto, nota-se a importância desse estudo como forma de compreensão acerca da ação do vírus na morfologia do aparelho digestório, sabendo-se que o intestino compreende uma ligação direta com outros órgãos, que o



torna um eixo para várias modificações de cunho imunológico e funcional. Desse modo, esse estudo poderá servir de modelo experimental para outros estudos com a abordagem do SARS-CoV-2.

## **Metodologia**

Nesse estudo foi utilizado camundongos C57BL/6 machos com peso entre 20 a 24g, oriundos do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC, onde foram guardados em gaiolas microisoladoras, com o controle da temperatura e ciclo claro/escuro, mantidos com ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a essas condições por todo o período experimental, onde foram divididos em grupos e cada grupo experimental compreendeu de 5 a 8 animais em cada, anteriormente aos experimentos, os animais foram sujeitos a um jejum de 18 a 24 horas, recebendo apenas água. Os animais foram eutanasiados após a anestesia com sobredose de cetamina-xilazina. Os cuidados e esforços foram tomados para minimizar o sofrimento dos animais em acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e normas internacionais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy of Science, EUA, 1996*).

Todas as substâncias e medicamentos utilizados nesse estudo foram dissolvidos em solução salina ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). A glicoproteína S1 da espícula do vírus SARS-CoV-2 foram adquiridas da The Native Antigen Company (Kidlington, Oxfordshire, UK). Cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina foram obtidos da Syntec (Cotia, SP, Brasil).

A espícula do SARS-CoV2 no modelo de indução de doença intestinal, não compreende microrganismo vivo ou geneticamente modificados e também não utiliza material genético isolado, assim como de outros componentes do vírus SARS-COV-2 isolados. Não foi utilizado amostras contaminadas com o vírus SARS-COV2 e nem foi realizado o cultivo viral. Nesse estudo foi utilizado apenas glicoproteínas spike (ou espícula) recombinante do SARS-CoV2, obtidas do The Native Antigen Fabricant, que no seu "Data Sheet", garantem que a substancia não apresenta riscos de contaminação e não cria resíduos perigosos. Para a segurança na manipulação do material e injeção nos animais foram utilizados EPIs e capela de fluxo laminar.

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma combinação de cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e foi feita uma laparotomia mediana, onde foi realizada uma incisão abdominal para evidenciar o intestino delgado, as alças duodenais, jejunais e íleais (2–3 cm) foram isoladas usando suturas. A temperatura corporal foi mantida entre 36–38 °C usando uma almofada de aquecimento durante essa cirurgia. As alças intestinais foram inoculadas com 100 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) para o grupo controle e a S1 dissolvida em PBS na dose de 5 µg/alça para os grupos S1. Os camundongos foram acondicionados após o fechamento da incisão abdominal feito com suturas.

Quatro horas após o procedimento, os animais foram eutanasiados e as alças foram ligeiramente retiradas da cavidade abdominal.

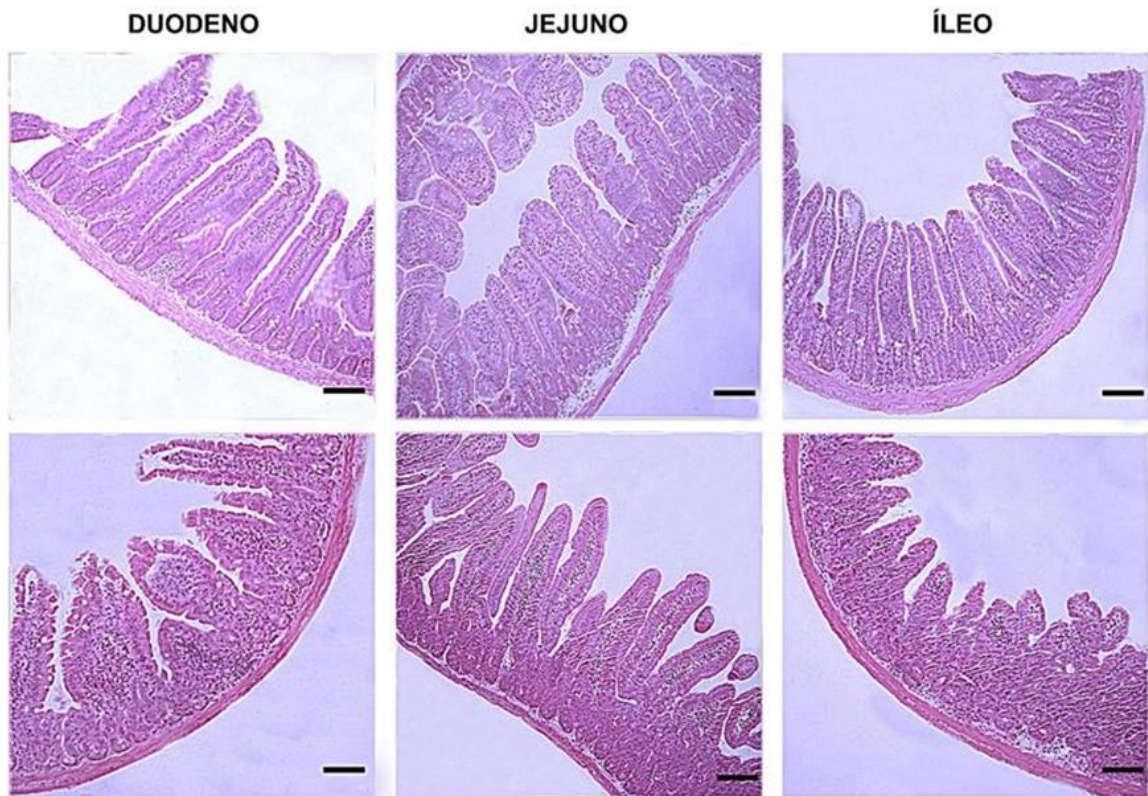
#### Análise histopatológica e Morfometria do Intestino delgado:

Após o sacrifício dos animais por sobredose anestésica, foi removido um segmento de 0,5 cm de duodeno, jejuno e íleo do camundongo. A seguir, essas amostras serão 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).

## **Resultados**

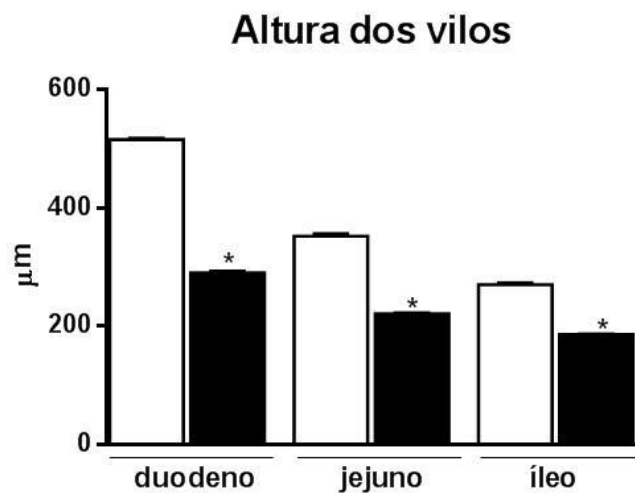
### **Avaliação das alterações histológicas na no modelo de indução de doença intestinal e tratados com salina e espícula do SARS-CoV2**

O modelo de indução da espícula nos camundongos causou uma resposta inflamatória com aumento de infiltrados celulares em todas as porções do intestino delgado, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle que receberam solução salina (100 µL). Além disso, foram identificados atrofia dos vilos e desarranjo das criptas, ao contrário do que foi evidenciado no grupo controle. (Figura 1).



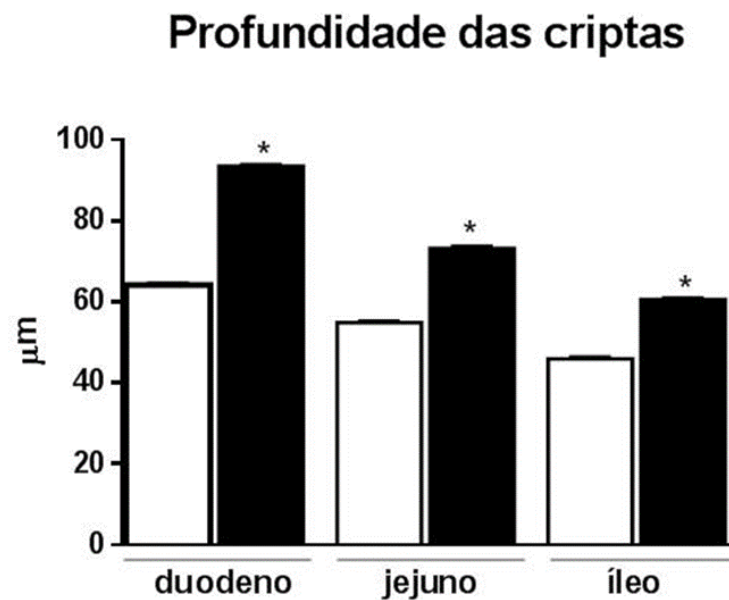
**Avaliação morfométrica da altura dos vilos nos animais desafiados com espícula do SARS-CoV2 e tratados com salina.**

A inoculação da espícula do SARS-CoV2 nos camundongos diminuiu significativamente ( $p < 0.001$ ) a altura dos vilos em comparação com o grupo controle. Essa diminuição foi mais evidente no duodeno ( Figura 2).



**Avaliação morfométrica da profundidade das criptas nos animais desafiados com a espícula do SARS-CoV2 e tratados com salina.**

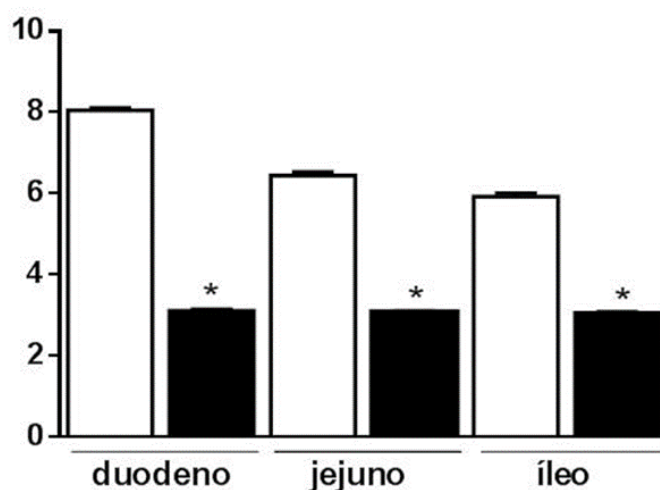
O desafio da espícula do SARS-CoV2 nos camundongos aumentou significativamente ( $p < 0.001$ ) a profundidade das criptas em comparação com o grupo controle. Esse aumento foi mais evidente no duodeno. (Figura 3).



**Avaliação morfométrica da razão vilo/cripta nos animais desafiados com a espícula do SARS-CoV2 e tratados com salina.**

O desafio espícula do SARS-CoV2 nos camundongos diminuiu significativamente ( $p < 0.001$ ) a razão vilo/cripta em comparação com o grupo controle. Essa diminuição foi mais evidente no duodeno. (Figura 4).

## Razão vilo/cripta



## Discussão

A entrada do vírus SARS-CoV em uma célula hospedeira é mediada pela relação entre o receptor do hospedeiro, que corresponde a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e a proteína do pico viral (CUI, JIE *et al.*, 2019). No tocante a estruturação do domínio de ligação ao receptor, a característica genômica do SARS-CoV-2 demonstra um elevado grau de equivalência entre este e o SARS-CoV, apontando que o vírus atual poderia se ligar a ACE2, causando assim a infecção em humanos (LU, ROUJIAN *et al.*, 2020). A espícula é composta funcionalmente por 2 subunidades, S1 e S2, onde o vírus utiliza a ACE2 para a entrada (ZHOU, PENG *et al.*, 2020). A afinidade de ligação com o receptor ACE2 é que vai prosseguir na infectividade do vírus (WAN, YUSHUN *et al.*, 2020).

No que diz respeito ao trato gastrointestinal, evidências demonstram que a COVID-19 pode afetar o sistema digestório, devido a elevada coexpressão de ACE2 e serina protease TMPRSS2 observadas nos enterócitos (HOFFMANN, MARKUS *et al.*, 2020). Certamente, a infecção pelo SARS-Cov-2 pode provocar uma alteração na permeabilidade intestinal, ocasionando em má absorção dos enterócitos (GU, JINYANG, BING HAN E JIAN WANG. 2020).

Nos achados de uma pesquisa realizada na China, apontaram que cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 internados, apresentaram

sintomas intestinais, com uma maior frequência para anorexia e diarreia, fato este, fundamental para se estabelecer, não só um cuidado no monitoramento dos sintomas respiratórios como também relacionados aqueles que apresentem sintomas extrapulmonares ou ao diagnóstico tardio até surgimento dos sintomas respiratórios. Esta hipótese é corroborada nessa pesquisa, onde indica que os pacientes com sintomas intestinais apresentaram um tempo consideravelmente maior do início à admissão do que aqueles sem os sintomas, associados, possivelmente a esse contexto (PAN L, MU M, YANG P, *et al*, 2020).

No presente estudo, foi demonstrado que a expressão das paredes intestinais pode levantar preocupações sobre a influência do trato gastrointestinal como um fator de risco, sendo associadas a níveis inflamatórios de SARS-CoV-2 e possíveis complicações da COVID-19. As alterações morfológicas intestinais observadas podem estar relacionadas a características clínicas demonstradas em outras literaturas, em que demonstram alta suscetibilidade a diversos sintomas gastrointestinais, mais comumente diarreia, náuseas / vômitos e dor abdominal, isso pode se dar devido as atrofia das vilosidades e nas criptas intestinais, onde possuem células especializadas na produção de enzimas de defesas.

De acordo com VENEGAS-BORSELLINO, CARLA *et al.* 2021, a espícula do SARS-CoV-2 ao entrar nas células por meio do receptor ACE2 no intestino delgado, uma fonte bastante comum de inflamação intestinal, pode ser o grande responsável pela prevalência do sintoma de diarreia. Além disso, estudos recentes apontam que indivíduos afetados pela doença desenvolve modificações importantes no microbioma intestinal, compreendendo uma redução de bactérias que produzem ácidos graxos de cadeia curta, os quais são moléculas responsáveis por regular as células intestinais e defesa do organismo.

## **Conclusão**

A relevância da homeostase intestinal e da resposta imune pertinente para infecções virais ganhou estímulo durante a pandemia de COVID-19. Sabe-se que o Sars-Cov-2 pode afetar não só o sistema respiratório, como também provocar danos multissistêmicos, porém as consequências clínicas do vírus e o papel do trato gastrointestinal ainda é amplamente subestimado. Nesse estudo, foi demonstrado que

a espícula do vírus pode induzir alterações na morfologia da parede intestinal e manter um estado pró-inflamatório de relevância clínica, podendo contribuir para desequilíbrios morfofuncionais do organismo. Foi visto que a resposta inflamatória repercutiu em todas as porções do intestino delgado e essa derivação provocou um processo atrófico das vilosidades e desarranjo das criptas intestinais, que se traduziu na redução da altura dos vilos e aumento da profundidade das criptas, tendo destaque no duodeno para ambos, podendo desencadear sintomas característicos do trato gastrointestinal e danos na permeabilidade intestinal, provocando em má absorção dos enterócitos. Porém, faz-se necessário mais estudos para explorar os mecanismos intestinais, assim como as características morfológicas no curso dos efeitos deletérios provocados na indução viral.

## Referências

- ALEEM A, SHAH H. Manifestações gastrointestinais e hepáticas do coronavírus (COVID-19) [Atualizado em 18 de julho de 2021]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570562/>. Acesso em 25 de out. 2021.
- 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 12 de out. 2021.
- CUI, JIE *et al.* "Origin and evolution of pathogenic coronaviruses." *Nature reviews. Microbiology* vol. 17, n.3, p. 181-192, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30531947/> Acesso em 23 de nov. 2021.
- DING S, LIANG TJ. "O SARS-CoV-2 também é um patógeno entérico com potencial transmissão fecal-oral? Uma revisão clínica e virológica COVID-19. " *Gastroenterology*. vol. 159, n. 1. P. 53-61. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7184994/>. Acesso em: 02 de nov. 2021.
- GU, JINYANG, BING HAN E JIAN WANG. "COVID-19: manifestações gastrointestinais e potencial transmissão fecal-oral." *Gastroenterology* vol. 158, n. 6, p. 1518-1519, 2020. Disponível em: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(20\)30281-X/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(20)30281-X/fulltext). Acesso em 22 de nov. 2021.

HOFFMANN, MARKUS *et al.* "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor." *Cell* vol. 181,n. 2, p. 271-280.e8, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/>. Acesso em 20 de nov. 2021.

LU, ROUJIAN *et al.* "Caracterização genômica e epidemiologia do novo coronavírus de 2019: implicações para as origens do vírus e ligação ao receptor." *Lancet* (Londres, Inglaterra) vol. 395,n.10224, p. 565-574, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007145/>. Acesso em 23 de nov. 2021.

PAN L, MU M, YANG P, *et al.* Características clínicas de pacientes com COVID-19 com sintomas digestivos em Hubei, China: um estudo descritivo, transversal e multicêntrico. *The American Journal of gastroenterology* , vol. 115, n. 5, p. 766-773, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7172492/>. Acesso em: 28 de nov. 2021.

VENEGAS-BORSELLINO, CARLA *et al.* "Impact of COVID-19 on the Intestinal Microbiome." *Relatórios de nutrição atuais*, 1-7. 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8609508/>. Acesso em: 17 out. 2021.

WAN, YUSHUN *et al.* "Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus." *Journal of virology* vol. 94,n. 7, p. e00127-20, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31996437/>. Acesso em: 22 de nov. 2021.

XIAO, FEI *et al.* "Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2." *Gastroenterology* vol. 158,6. 1831-1833.2020. doi: 10.1053 / j.gastro.2020.02.055 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7130181/>. Acesso em: 15 de out. 2021.

ZHOU, PENG *et al.* "Um surto de pneumonia associado a um novo coronavírus de provável origem em morcego." *Nature* vol. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32015507/>. Acesso em 23 de nov. 2021.