



EFEITO DA EXPOSIÇÃO À MICROPARTÍCULAS ISOLADAS DE PACIENTES PÓS-COVID-19 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS SAUDÁVEIS E SOB RESTRIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Palavras-Chave: CÉLULAS ENDOTELIAIS, ÓXIDO NÍTRICO, MICROPARTÍCULAS

Autoras:

JULIANA QUINHOLI ROCHA [FCF]

LETÍCIA BARSSOTTI DOS SANTOS [IB]

Prof.^a Dr.^a ANA PAULA COUTO DAVEL (orientadora) [IB]

INTRODUÇÃO:

Com mais de dois anos da pandemia pelo SARS-CoV-2, já foram comprovadas algumas de suas complicações como injúria e hiperativação das células endoteliais e intensificação na produção de fatores pró-inflamatórios e coagulantes. No entanto, há estudos questionando se esses efeitos em células endoteliais seriam diretamente relacionados à infecção das células pelo vírus, já que não foi encontrado vestígio viral em amostras de células endoteliais mesmo após detectada desregulação da homeostase. ^{[1][2]}

Paralelamente, muitos estudos correlacionam injúria endotelial à produção de micropartículas (MP), estruturas membranosas liberadas a partir de ativação ou apoptose celular. ^{[3][4][5]} Essas moléculas carregam moléculas bioativas e podem desencadear respostas vasculares como disfunção endotelial e estresse oxidativo. ^[6]

A partir disso, levantamos a hipótese de que micropartículas produzidas durante a infecção por coronavírus poderiam não apenas atuar de forma aguda sobre as células endoteliais, mas contribuir para quadros conhecidos como COVID longa, ou seja, para a persistência de sintomas, incluindo complicações cardiovasculares. Uma vez que evidências sugerem que a má-nutrição pode ser um dos agravantes da COVID-19, no presente estudo temos como objetivo investigar os efeitos de MP isoladas de pacientes com COVID-19 grave na função de células endoteliais controle e submetidas à restrição proteica. Especificamente, avaliou-se MP circulantes isoladas de pacientes que desenvolveram COVID-19 grave, que foram coletadas 1 e 6 meses após alta dos pacientes do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Essas MP foram adicionadas sobre células endoteliais *in vitro* para investigação de seu efeito sobre a liberação e biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio e morte celular em meio controle ou com restrição de aminoácidos.

METODOLOGIA:

ISOLAMENTO E CÁLCULO DE MICROPARTÍCULAS

Pacientes (n=10) previamente internados com COVID-19 grave foram recrutados no ensaio clínico “Inibição de Bradicininina em Adultos Hospitalizados com COVID-19 Grave” sob coordenação do Dr. Licio Augusto Velloso (FAPESP 2020/07673-4) e tiveram suas amostras sanguíneas coletadas 1 e 6 meses após alta hospitalar. A partir da coleta, o sangue foi centrifugado para obtenção do sobrenadante sem plaquetas, armazenado então a -80°C. Em seguida, o plasma foi diluído 1:1 em PBS estéril e ultracentrifugado (1 hora, 4°C, 20.000 g), permitindo o isolamento das micropartículas e sua quantificação através do equipamento Nanosight (NTA NanoSight NS300, multiusuário FAPESP 2014/14457-5). Os critérios de inclusão e exclusão encontram-se detalhados no estudo previamente publicado. [7][8]

CULTIVO CELULAR

Linhagens de células endoteliais de aorta bovina (Bovine Aortic Endothelial Cells - BAEC) foram cultivadas em garrafas T25 com meio DMEM (Meio Dulbecco MEM – Vitrocell 2513) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) até alcançada a confluência de 80%. A tripsinização nesse estágio é priorizada por conta da fase do crescimento celular, já que quando alcançado 100% de ocupação da garrafa, o crescimento exponencial (fase Log) é inibido pelo estímulo de contato. Dessa forma, quando subcultivadas, haveria maior demora no crescimento. [9]

Para a tripsinização era feita uma lavagem com 2 ml de Hanks (Sigma H6648) e adição de mesma quantidade de tripsina 0,25 % a 37°C (Sigma T3924) por 1 minuto, suficiente para o descolamento de todas as células da garrafa. A tripsina era então inibida com o dobro da quantidade de reagente específico (Sigma T6414) a 37°C e toda essa solução transferida a um Falcon de 15 ml para centrifugação (1500 rpm, 3 minutos). A partir disso, o sobrenadante era removido e o pellet ressuspenso para posterior contagem em câmara de Neubauer e subcultivado em uma nova garrafa ou placa.

INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS COM MICROPARTÍCULAS

Células BAEC foram cultivadas em placas de 96 poços. Quando alcançado 80% de confluência, as células foram tratadas com meio controle (Meio DMEM 100% aminoácidos – Grupo CTL) ou restrito (1:4 Meio DMEM 100% aminoácidos e Meio DMEM 0% aminoácidos – Grupo R), ambos suplementados com 10% de FBS por 48 horas. Além disso, as células endoteliais CTL ou R foram incubadas com as MP isoladas 1 e 6 meses após a alta hospitalar em duas concentrações (10^5 MP/ml e 10^6 MP/ml) por 24 horas. Como controle foi utilizado PBS filtrado. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE ÓXIDO NÍTRICO

Após o tratamento das células endoteliais CTL ou R com MP, foi feito o experimento para quantificação de óxido nítrico através da sonda fluorescente DAF-2 DA. Para tal, as células foram lavadas com solução de PBS + CaCl₂ (0,45mM) e incubadas com PBS + DAF-2 DA (5 µM, Sigma D225) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente as células foram fixadas com PFA 4% por 5 minutos a

temperatura ambiente e os núcleos marcados com DAPI também por 5 minutos. Os dados foram expressos em intensidade das células ao DAF pelo número de células totais marcadas com DAPI.

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Após o tratamento com meio restrição ou controle, por poço foi adicionado 100 µl de solução (PBS contendo glicose 11,1 mM, Amplex® Red Reagent 9 25 µM, horseradish peroxidase 0,2 U/ml; pH=7,4) no escuro, a 37°C, por 40 minutos. A fluorescência foi medida (excitação 530 nm; emissão 590 nm) a cada 10 minutos no equipamento SpectraMax M3. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente e coradas com cristal violeta (0,05% w/v) diluída em água destilada por 10 minutos. As células então foram lavadas e passaram novamente pelo SpectraMax M3. Os resultados foram expressos pela absorbância detectada.

PROTOCOLO DE MORTE CELULAR

As células apoptóticas foram avaliadas utilizando os corantes de ligação ao DNA Hoechst 33342 (1 mg/ml) e iodeto de propídio (1 mg/ml). Para isso, as células foram incubadas com HO-Pi durante 15 minutos na incubadora a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, as imagens foram adquiridas usando um sistema de imagem de alto conteúdo ImageCode™ Confocal da ImageXpress (MolecularDevices), com uma objetiva de 10 × PlanFluor equipado com filtro apropriado para HO (excitação em 377/50 nm e pico de emissão a 477/60 nm) ou Texas Red para Pi (excitação em 560/32 nm e pico de emissão a 624/40 nm) e utilizando o programa Meta Express 6 Software Guide do Módulo Live/Dead. O número total de células foi medido pela contagem dos núcleos marcados com HO e as células com núcleo apoptótico foram marcadas positivamente pelo Pi em quatro campos diferentes. Os resultados foram expressos como uma porcentagem do número de células em morte celular pelo número total de células por campo avaliado.

ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados obtidos foram realizados em duplicata e analisados a partir da razão entre Integrated Cell Intensity e Total Cells. As médias obtidas por duplicata foram normalizadas em relação a seus respectivos controles. Os resultados foram expressos em média±erro padrão (SEM) e analisados utilizando-se o software GraphPad Prism. A análise estatística foi feita pelo teste two-way ANOVA e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Como resultados observamos que a restrição de aa elevou a taxa de morte celular (+70,83%), assim como reduziu a liberação de NO (-34,13%) e H₂O₂ (-24,36%) nas células endoteliais. A incubação das células endoteliais com as MP isoladas de pacientes 1 e 6 meses pós-COVID-19, independente da dosagem, não alterou esses parâmetros quando em meio controle. No entanto, em meio com restrição

de aa, a exposição às MP de 1 e 6 meses, nas duas doses estudadas, resultou em aumento de H₂O₂, sem alterar a produção de NO ou a taxa de morte celular.

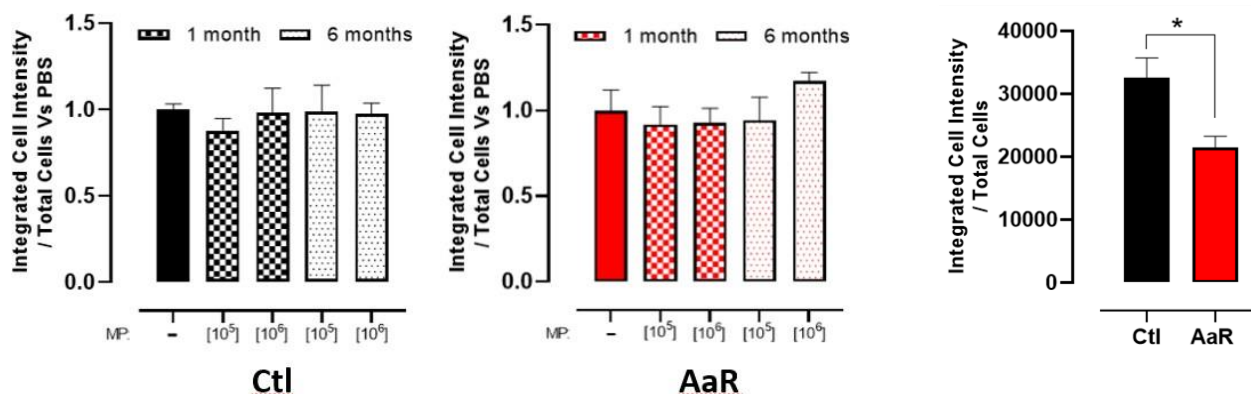


Figura 1. Quantificação de óxido nítrico em células endoteliais *in vitro* tratadas por 24h com meio controle ou restrito de aminoácidos e micropartículas (10⁵ e 10⁶ MP/mL) isoladas de pacientes que tiveram COVID-19 grave 1 (1M) e 6 meses após alta hospitalar.

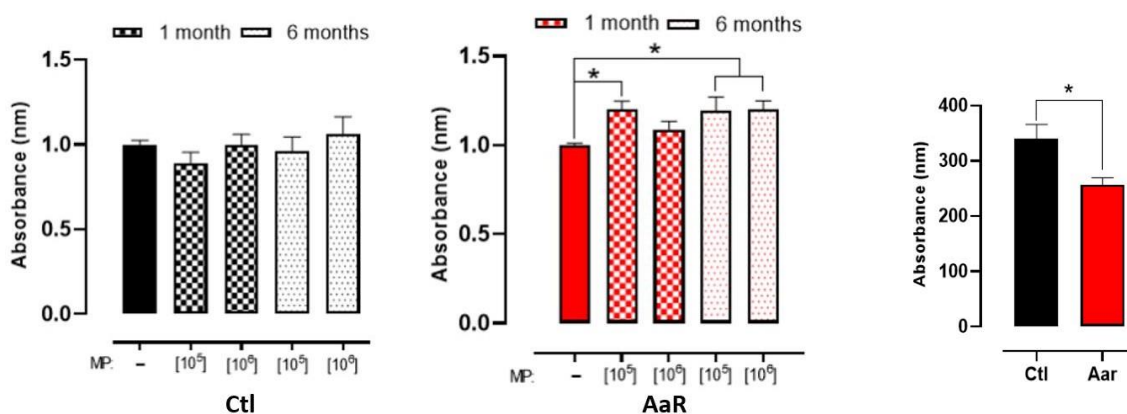


Figura 2. Quantificação de peróxido de hidrogênio em células endoteliais tratadas durante 24 horas com meio controle ou restrito aliado à incubação com micropartículas (10⁵ e 10⁶ MP/mL) isoladas de pacientes que tiveram COVID-19 grave 1 e 6 meses após alta hospitalar.

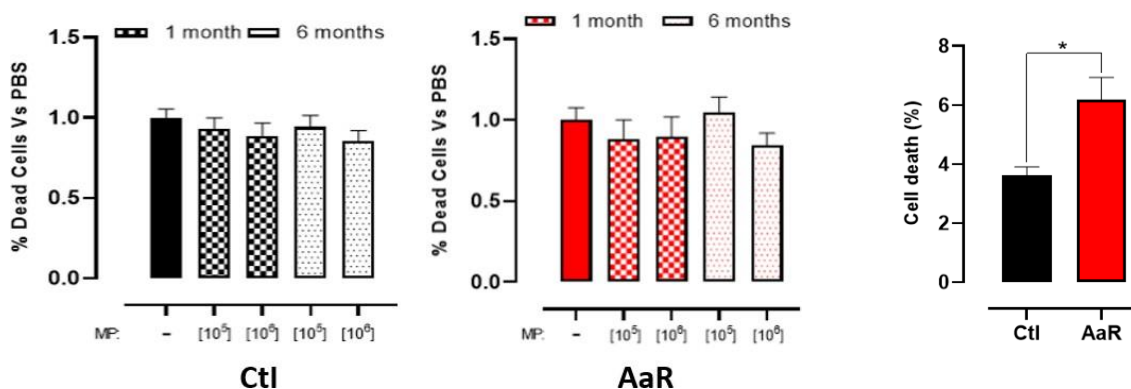


Figura 3. Dados referentes à análise de apoptose celular em células endoteliais tratadas com meio controle ou restrito durante 24 horas somadas à incubação com micropartículas (10^5 e 10^6 MP/ML) isoladas de pacientes que receberam alta de COVID-19 grave

CONCLUSÕES:

Em conjunto, os dados sugerem que a restrição de aa in vitro causa disfunção da célula endotelial, com aumento da morte celular e redução da liberação de NO e H₂O₂. As MP isoladas na fase pós-COVID grave não afetaram os parâmetros avaliados em células endoteliais controle. Porém, na situação de restrição de aa, as MP 1 e 6 meses pós-COVID elevaram a produção de H₂O₂. Assim, a restrição de aa pode ser um fator de risco para a atividade das MP elevarem a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS)

BIBLIOGRAFIA

[1]: Schimmel L, Chew KY, Stocks CJ, Yordanov TE, Essebier P, Kulasinghe A, Monkman J, Dos Santos Miggiolaro AFR, Cooper C, de Noronha L, Schroder K, Lagendijk AK, Labzin LI, Short KR, Gordon EJ. Endothelial cells are not productively infected by SARS-CoV-2. *Clin Transl Immunology*. 2021 Oct 24;10(10):e1350. doi: 10.1002/cti2.1350. PMID: 34721846; PMCID: PMC8542944.

[2]: Blerina Ahmetaj-Shala, Thomas P. Peacock, Laury Baillon, Olivia C. Swann, Hime Gashaw, Wendy S. Barclay, Jane A. Mitchell bioRxiv 2020.11.08.372581; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.08.372581>

[3]: Tual-Chalot, S., et al., Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(2): p. 261-8.

[4]: Hijmans, J.G., et al., Circulating Microparticles Are Elevated in Treated HIV -1 Infection and Are Deleterious to Endothelial Cell Function. *J Am Heart Assoc*, 2019. 8(4): p. e011134

[5]: Soriano, A.O., et al., Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med*, 2005. 33(11): p. 2540-6.

[6]: Lovren, Fina; Verma, Subodh. Evolving Role of Microparticles in the Pathophysiology of Endothelial Dysfunction. *Clinical Chemistry*, Volume 59, Issue 8, 1 August 2013, Pages 1166–1174.

[7]: Mansour E, Palma AC, Ulaf RG, Ribeiro LC, Bernardes AF, Nunes TA, Agrela MV, Bombassaro B, Monfort-Pires M, Camargo RL, Araujo EP, Brunetti NS, Farias AS, Falcão ALE, Santos TM, Trabasso P, Dertkigil RP, Dertkigil SS, Moretti ML, Velloso LA. Safety and Outcomes Associated with the Pharmacological Inhibition of the Kinin-Kallikrein System in Severe COVID-19. *Viruses*. 2021 Feb 16;13(2):309. doi: 10.3390/v13020309. PMID: 33669276; PMCID: PMC7920028.

[8]: Mansour, E., Bueno, F.F., de Lima-Júnior, J.C. et al. Evaluation of the efficacy and safety of icatibant and C1 esterase/kallikrein inhibitor in severe COVID-19: study protocol for a three-armed randomized controlled trial. *Trials* 22, 71 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13063-021-05027-9>

[9]: Straube, Tamara; Müller, Claudia. How to do a Proper Cell Culture Quick Check. Leica Microsystems. March 24, 2016