



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CAMPUS TOLEDO

**CURSO DE MEDICINA**



### PROGRAMA DE VOLUNTARIADO ACADÊMICO

#### TRADUÇÃO LIVRE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS SOBRE O COVID-19

Este projeto visa realizar a tradução livre de artigos científicos relacionados ao COVID-19, publicados em revistas internacionais de renome, com o objetivo de fornecer material traduzido e facilitar a compreensão e acesso à informação relevante aos profissionais de saúde de diversas áreas e a população em geral. Não há conflitos de interesse.

**Título original:** SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion

**Autores:** WANG, Xinling; XU, Wei; HU, Gaowei; XIA, Shuai et al.

**Publicado em:** Nature: Cellular & Molecular Immunology; April 07, 2020

**DOI:** <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0424-9>

#### Correspondência

### **SARS-CoV-2 infecta linfócitos T através de fusão com a membrana mediada por seu receptor de superfície celular (spike protein).**

COVID-19, a nova doença de coronavírus causada pelo SARS-CoV-2 que teve seu surto no final de 2019 em Wuhan, China,<sup>1</sup> tornou-se uma pandemia em todo o mundo. SARS-CoV-2 pertence ao gênero betacoronavirus e possui 79,5% de compatibilidade com o SARS-CoV. SARS-CoV-2 utiliza a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) do hospedeiro como seu receptor para entrada na célula.<sup>2</sup> As manifestações clínicas da COVID-19 incluem pneumonia, diarreia, dispneia e falência de múltiplos órgãos. De modo interessante, a linfocitopenia, como um indicador diagnóstico, é comum em pacientes da COVID-19. Xiong et al. descreveu que as vias de apoptose, autofagia e p53 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) encontram-se com aumento de expressão em pacientes

com COVID-19.<sup>3</sup> Alguns estudos relataram que a linfocitopenia pode estar associada à mortalidade, principalmente em pacientes com baixos níveis de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.<sup>4,5</sup> Linfocitopenia também foi encontrada em casos de Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). MERS-CoV pode infectar diretamente os linfócitos T humanos e induzir a apoptose de células T através de vias extrínsecas e intrínsecas de apoptose, mas não pode se replicar nos linfócitos T.<sup>6</sup> No entanto, não está claro se o SARS-CoV-2 também pode infectar as células T, resultando em linfocitopenia.

Buscando responder este questionamento, nós avaliamos a suscetibilidade dos linfócitos T à infecção pelo SARS-CoV-2. Para alcançar este feito, SARS-CoV e SARS-CoV-2 pseudotipados foram envelopados com base em métodos previamente descritos.<sup>7</sup> Os pseudovírus foram capazes de infectar células permissivas (células 293T/ECA2 e Huh7) que expressam receptores ECA2, mas não infectaram células não permissivas (células HeLa) (Figura 1a). Utilizamos pseudovírus com infectividade igual para células 293T/ECA2 (Figura 1c) para infectarem duas linhagens de linfócitos T, MT-2 e A3.01, com níveis de expressão

de hECA2 e mRNA baixíssimos, próximo ao negativo (Figura 1b). Surpreendentemente, em várias replicações, nós observamos que as linhagens de células T foram mais sensíveis à infecção pelo SARS-CoV-2 em comparação ao SARS-CoV (Figura 1c). Em outras palavras, estes resultados nos mostram que os linfócitos T podem ser mais permissivos à infecção pelo SARS-CoV-2 e menos permissivos à infecção pelo SARS-CoV, semelhante a achados de estudo prévio.<sup>6</sup> Portanto, é plausível que a proteína S do SARS-CoV-2 possa intermediar potente infectividade, mesmo nas células com baixa expressão de hECA2, o que poderia, por sua vez, justificar porque a taxa de transmissão da SARS-CoV-2 é tão alta. Também é possível que outros receptores permitam a entrada de SARS-CoV-2 nas células T, como CD147, presente nas superfícies dos linfócitos T,<sup>8</sup> recentemente relatado como uma nova via de invasão para o SARS-CoV-2.<sup>9</sup>

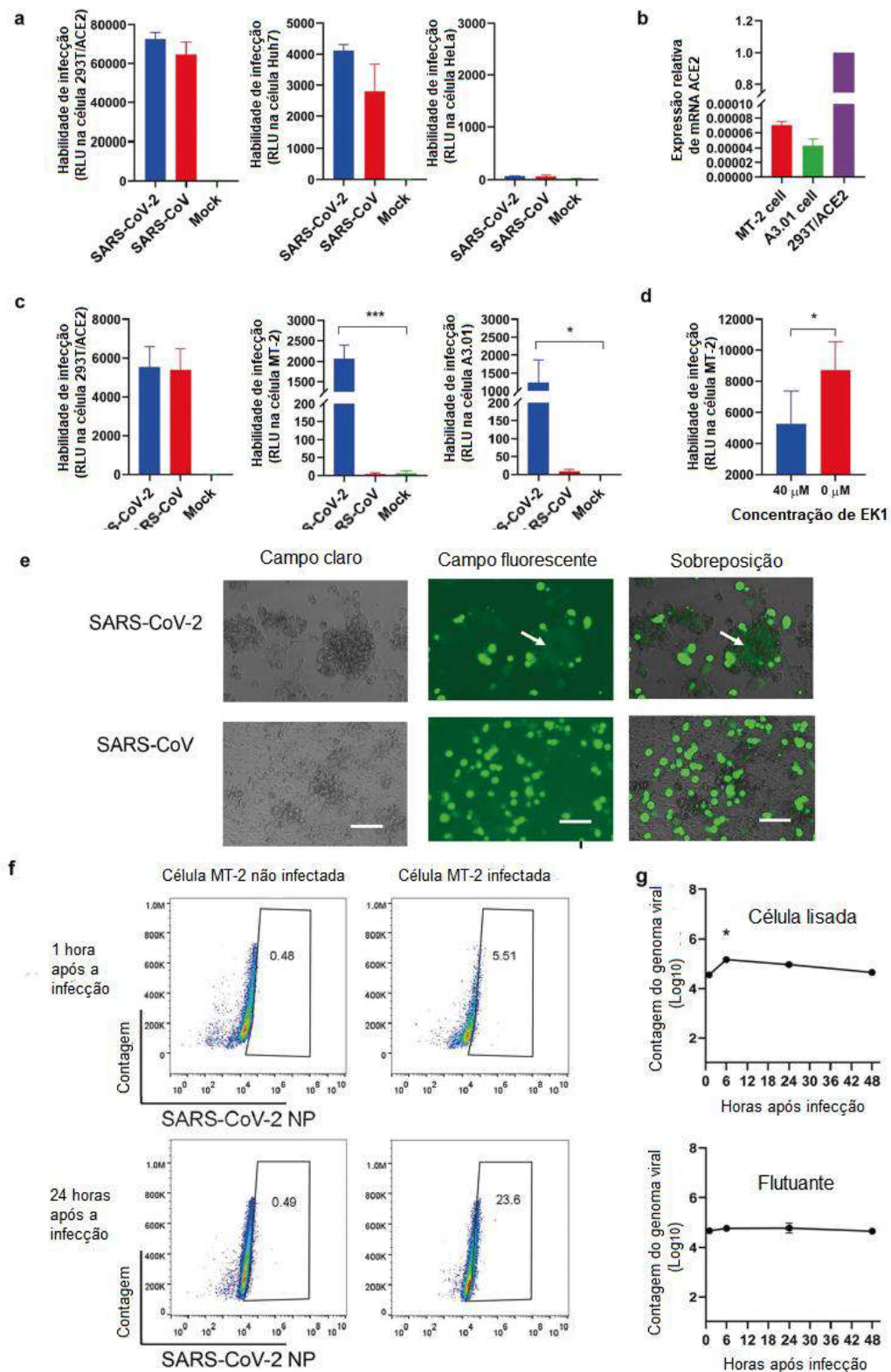
Para determinar se o SARS-CoV-2 adentra nos linfócitos T através de endocitose não mediada por receptores, nós usamos peptídeo EK1, que tem mostrado ser inibidor da proteína S do SARS-CoV-2, mediando fusão célula-célula e infecção por pseudovírus.<sup>7,10</sup> Especificamente, ele inibe a infecção mediada por receptores através da interação com HR1 bloqueando a formação de feixe de seis hélices (6-HB), posteriormente inibindo a fusão entre as membranas viral e da célula-alvo. Nós descobrimos que o peptídeo EK1 tem atividade inibitória significativa contra pseudovírus SARS-CoV-2 em células MT-2 (Figura 1d), sugerindo que a entrada do vírus depende de fusão mediada por receptor. No entanto, o EK1 teve atividade inibitória em células MT-2 somente em altas concentrações (40 $\mu$ M). Ao mesmo tempo, o valor IC50 do EK1 foi de 2,38 $\mu$ M em células 293T/ECA2.<sup>10</sup> Estes resultados sugerem que o SARS-CoV-2 também possa entrar em linfócitos T através da via de endocitose mediada por receptores. Para tornar mais claro, nós realizamos um ensaio com fusão célula-célula de SARS-CoV-2 mediada por proteína S, seguindo estudos prévios.<sup>7,10</sup> Após 48h de cultura, 293T células expressando proteína S do SARS-CoV-2 sofreram fusão com células MT-2. Comparado com células não-

fusionadas, as células em fusão se concentraram e apareceram como uma grande massa fluorescente verde-claro. Em contraste, nenhuma célula fusionada foi encontrada nas culturas de SARS-CoV (Figura 1e). Portanto, é possível concluir que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar células T através de fusão de membranas mediada por proteína S.

Com o objetivo de determinar a suscetibilidade das células MT-2 ao vírus vivo, nós usamos SARS-CoV-2 para infectar células MT-2 e detectamos a presença de nucleoproteína (NP) do SARS-CoV-2 como descrito previamente<sup>6</sup>. Notavelmente, inúmeras células MT-2 foram infectadas com SARS-CoV-2 (Figura 1f). Quantitativamente, a porcentagem de células MT-2 positivas para NP de SARS-CoV-2 foi 23,11% maior que aquelas células não infectadas 24 horas após a infecção, o que representa aproximadamente 4,6 vezes da porção em 1h (Figura 1f). Este resultado aponta que o vírus penetrou as células MT-2 em 24h e as infectou.

Considerando que o MERS-CoV consegue infectar eficientemente, mas não se replicar, em linfócitos T<sup>6</sup>, nós detectamos o número de cópias do genoma viral em diferentes tempos após a infecção, de modo a explorar as características da replicação do SARS-CoV-2 em células MT-2. Semelhante ao MERS-CoV, o SARS-CoV-2 não foi capaz de se replicar em células MT-2 (Figura 1g). O número de cópias do genoma viral em 6h foi significativamente maior que em qualquer outro período de tempo no lisado celular, mas permaneceu constante em todos os períodos nos sobrenadantes. Estes resultados sugerem que o SARS-CoV-2 é capaz de entrar em células MT-2 em 6h após a infecção, mas não se replica, e em seguida o RNA viral é degradado. Em sobrenadantes, as cópias virais detectadas podem ser resultado de vírions residuais, semelhante a achados prévios de estudo com MERS-CoV (Figura 1g)<sup>6</sup>.

Com base nos resultados de infecções por pseudovírus e vírus vivo, nós provamos que: (1) SARS-CoV-2 é capaz de infectar células T, (2) o SARS-CoV-2 infectou as células T por fusão de membranas dependente de receptores, mediada por proteína S, e



**Fig. 1** Sensibilidade dos linfócitos T à infecção por SARS-CoV-2. **a** A infecção por pseudotipos de SARS-CoV-2 e SARS-CoV. 293T/ACE2 e Huh7 são células permissivas, enquanto HeLa é uma linha de células não permissivas. **b** Expressão de mRNA ACE2 em células T. células 293T/ACE2 usadas como controle. **c** Infecção por pseudotipos de SARS-CoV-2 e SARS-CoV em linhagens de células linfoides T. **d** Inibição do peptídeo EK1 nos pseudotipos SARS-CoV-2 em células MT-2. **e** Fusão SARS-CoV-2 célula-célula mediada por S nas células MT-2. As células MT-2 foram cocultivadas com as células 293T/ SARS-CoV-2/EGFP. A fusão célula-célula foi fotografada sob microscopia óptica com fluorescência ou luz visível.

As células fundidas foram indicadas com uma seta branca. Barras de escalas 800µm. f Detecção de células NP-positivas SARS-CoV-2 com citometria de fluxo. Células MT-2 foram infectadas com SARS-CoV-2 em 1TCID50 por célula, respectivamente. As células foram fixadas e permeabilizadas em 24 e 48h após a infecção e marcadas imunologicamente para detecção de NP SARS-CoV-2. g A infecção de células MT-2 por SARS-CoV-2 é abortiva. As células foram inoculadas com SARS-CoV-2 em 1TCID50 por células e colhidas em 1, 6, 24 e 48 horas após a infecção. As células lisadas (acima) e flutuantes (abaixo) foram coletadas para detecção do gene viral N com RT-qPCR. Em painéis, barras e barras de erro representam desvios médios e padrões. Análise estatística foi realizada utilizando t-teste não pareado. \*p<0,05

(3) a infecção poderia ser inibida por peptídeo EK1. Entretanto, observamos uma expressão bem baixa do nível de hACE2 nas células T; portanto, propusemos que um novo receptor pode mediar a entrada de SARS-CoV-2 nas células T. Similar ao MERS-CoV, a infecção das células T por SARS-CoV-2 é abortiva. Um estudo recente reportou que as leituras virais mal mostraram as amostras de PBMC de pacientes com a COVID-19 por meio do sequenciamento do transcriptoma de RNAs. Deste modo, foi inferido que o SARS-CoV-2 não poderia infectar as PBMCs. Contudo, as características transcriptômicas das PBMCs de três pacientes foram detectadas e analisadas. Duas leituras de SARS-CoV-2 foram detectadas nas PBMCs de um dos pacientes, e nenhuma leitura nos outros. Tal resultado poderia ser atribuído à replicação não produtiva do SARS-CoV-2 em linfócitos T, com pequeno genoma viral nas PBMCs possivelmente degradando na coleta de amostra e no processo de extração de RNA. Assim, as questões da infecção e replicação em células T primárias e se a infecção induz ou não a apoptose das células T ainda necessitam de mais pesquisa, potencialmente evocando novas ideias sobre os mecanismos de patogenicidade e intervenções terapêuticas.

## RECONHECIMENTOS

Somos muito gratos a Qian Wang, Core Facility of Microbiology and Parasitology (SHMC), Universidade Fudan. Este trabalho foi apoiado pelo National Megaprojects of China for Major Infectious Diseases e o National Natural Science Foundation of China

## INFORMAÇÃO ADICIONAL

Conflito de interesses: Os autores não declaram conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

1. Jiang, S. et al. A distinct name is needed for the new coronavirus. *Lancet* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30419-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30419-0) (2020).
2. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
3. Xiong, Y. et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3549993> (2020).
4. Zeng, Q. et al. Mortality of COVID-19 is Associated with Cellular Immune Function Compared to Immune Function in Chinese Han Population (2020). Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.20031229> (2020).
5. Zheng, M. et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2> (2020).
6. Chu, H. et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus efficiently infects human primary T lymphocytes and activates the extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *J. Infect. Dis.* 213, 904–914 (2016).
7. Xia, S. et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci. Adv.* 5, eaav4580 (2019).

8. Koch, C. et al. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *Int. Immunol.* 11, 777–786 (1999).
9. Wang, K. et al. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.988345> (2020).
10. Xia, S. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infection (previously 2019-nCoV) by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.* <https://doi.org/10.1038/>
- 

**Traduzido por**<sup>1</sup>: Larissa Panatta e Marcella Dellatorre Pucci

**Revisado por**<sup>1</sup>: Flávia Renata Ropelatto Pires e Sofia Mitsue Ishie

**Supervisão**<sup>2</sup>: Eduardo Gomes

1. Acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Paraná (UFPR), campus Toledo.
2. Médico urologista e professor do curso de Medicina da UFPR, campus Toledo.