

ANÁLISE DA EXPRESSÃO TECIDUAL IMUNO-HISTOQUÍMICA DA CONEXINA-43 EM AMOSTRAS DE RIM DE PACIENTES SARS-COV-2 POSITIVO

Lucas Segaspini Felber¹
Lucas Mazzo Ricca²
Letícia Marcinichen Pozzobon³
Leonardo Ivantes Mesa⁴
Matheus Leitão Teixeira de Freitas⁵
Thiago Lemes Augusto⁶
Luisa Gabriela Dias de Oliveira⁷
Juliana Belloni Passerino⁸
Julya de Carvalho Felber⁹

RESUMO: No século XXI, o mundo foi atingido pelo vírus influenza A H₁N₁, e poucos anos após, uma nova cepa viral se desenvolveu, SARS-CoV-2, que ficou conhecida como o vírus da COVID-19. O vírus é sistêmico, atingindo vários órgãos durante a infecção, dentre eles os rins. Dentre os componentes endoteliais que atuam na coordenação celular, a Conexina-43 foi escolhida como objeto de estudo do projeto. **Objetivos:** O objetivo foi estudar a expressão tecidual da Conexina-43 em amostras de pacientes que vieram a óbito por COVID-19 e comparar sua expressão com um grupo controle. **Materiais e métodos:** Os primeiros foram obtidos por meio de biópsia *post-mortem* nos quais a infecção por COVID-19 foi confirmada. 18 amostras foram coletadas e comparadas com o grupo controle, composto por 22 amostras. As amostras foram analisadas por software, o qual gerou milhares de imagens por meio de cortes aleatórios. Destas, foram selecionadas 20 imagens de cada amostra, de forma aleatória. Após obter tais imagens, foi utilizado outro software (Image-Pro Plus versão 4.5) para quantificar a expressão da Conexina-43 em cada corte, e essa expressão foi comparada com o grupo controle. **Resultados:** Os resultados obtidos foram de 37,2% para as amostras controle e 21,3% para as amostras do grupo COVID. Dessa forma, houve uma redução de 15,9% na expressão entre grupo controle e COVID. **Conclusão:** A expressão de Conexina-43 em pacientes que vieram a óbito por COVID 19, embora tivesse elevada em amostras de trato respiratório em outros estudos, encontrou-se diminuída no sistema renal. Isso pode ser explicado pelo ambiente criado pelo vírus. Por ser um ambiente permeado pela hipóxia e inflamação, os rins sofreram necrose e a expressão de Conexina-43 naturalmente diminuiu. Apesar de não seguir a expressão encontrada no sistema respiratório, o resultado auxilia na compreensão da lesão renal causada pelo SARS-CoV-2, possibilitando elaboração de novos estudos na área para possíveis alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Conexina-43. SARS-CoV-2. Rim. Infecção. Angiogênese.

¹Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

²Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

³Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁴Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁵Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁶Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁷Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁸Discente do curso de Medicina na Universidade Católica do Paraná.

⁹Discente do curso de Medicina na Universidade Positivo.

INTRODUÇÃO

Em 2009 o mundo vivenciou uma pandemia de vírus influenza A H1N1 (Herendeen *et al.*, 2000; Brehmer *et al.*, 2011). Em pouco tempo, o vírus espalhou-se, levando centenas de pessoas à óbito (CDC, 2019). Dez anos depois, surge em Wuhan na China uma nova cepa de vírus denominada SARS-CoV-2 causadora da doença COVID-19, com taxa de mortalidade média atual 10 vezes mais letal que o H1N1(OMS) (Li Q *et al.*, 2020; WHO, 2020). O vírus causa pneumonia lobar progressiva assim como o H1N1, entretanto, apresenta-se com manifestações extrapulmonares, como: distúrbios de coagulação, trombose venosa profunda, lesões cardíacas e renais, lesões endoteliais e resposta inflamatória sistêmica (Oudit *et al.*, 2009; Varga *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). A secreção de citocinas inicia o processo inflamatório frente a infecções, dentre elas as virais. A cascata inflamatória depende, entre outros, de ativação e resposta endotelial, já que essas células participam intimamente da sinalização e recrutamento de células do sistema imune (Schnyder-Candrian S. *et al.*, 2006). Embora o sistema respiratório seja o mais afetado pelo vírus, marcadores de lesão endotelial se encontram em níveis elevados durante o curso da doença, resultando de processos de inflamação sistêmica (Ma *et al.*, 2022; Qian *et al.*, 2021a).

As junções intercelulares têm importante função de comunicação e barreira nos tecidos fazendo parte então da coordenação do funcionamento celular, sobretudo nas células endoteliais (Beyer & Berthoud, 2018). Dentre as proteínas que exercem esta função, a Conexina-43 parece desenvolver um importante papel. As junções intercelulares, em condições normais, participam da troca de metabólitos e também de resposta imunológica, além de exercer função de barreira celular tecidual. Neste contexto, a infecção viral pelo SARS-CoV-2 sabidamente atinge as células endoteliais, e esse processo pode promover quebra desta barreira por intervenção na atividade das proteínas participantes das junções intercelulares. Evidenciou-se que durante processos inflamatórios e infecciosos, conexinas são translocadas para a membrana celular como forma de resposta imune, indicando sua atuação e possível alvo para novos medicamentos (Chanson *et al.*, 2005). Durante situações de inflamação, ocorre sua fosforilação, a qual acaba por danificar processos de sinalização e comunicação intercelular, prejudicando assim a homeostase do organismo (Zhang; Wang; Chen, 2023). Estudos recentes demonstram que em pacientes com doença renal crônica, uma doença inflamatória, podem apresentar uma expressão descontrolada de conexina-43 em células epiteliais tubulares renais e também em novos focos de lesão inflamatória (Hillis *et al.*, 1997). Dessa forma, a função da

conexina-43 passou a ser alvo de estudo em casos de doença renal, sendo encontrada diversas relações da proteína e sua fisiopatologia renal (Prakoura, Kavvadas, Chadjichristos, 2018; Price *et al.*, 2020).

Como dito anteriormente, o COVID-19 é uma doença acompanhada por inflamações sistêmicas, sendo assim, a forma com a qual o vírus ataca o sistema renal é de suma importância para buscar uma forma de aliviar os sintomas da doença (Bell *et al.*, 2024). Cerca de 40% dos pacientes infectados pelo vírus, desenvolvem lesões renais agudas, as quais tem sua fisiopatologia cerceada por inflamações, e pode-se também destacar os impactos negativos para portadores de doença renal crônica que foram infectados pelo SARS-CoV-2, sobretudo na piora da qualidade e longevidade de vida (KLOMJIT *et al.*, 2023). Além disso, é necessário destacar que inúmeras injúrias renais foram encontradas por meio de biópsias renais de pacientes com COVID-19, embora com dados que contemplam apenas até novembro de 2020, a tabela abaixo indica os dados de autópsia renal dos principais artigos publicados até a data em questão (Figura abaixo) (SHARMA *et al.*, 2021).

Figura 1 - Dados renais de pacientes que vieram a óbito por covid

Summary of autopsy studies associated with COVID-19 and the kidney							
Author (ref #)	Bradley <i>et al.</i> [7]	Golmai <i>et al.</i> [8]	Hanley <i>et al.</i> [23]	Rommelink <i>et al.</i> [18]	Santoriello <i>et al.</i> [11]	Su <i>et al.</i> [13]	Puelles <i>et al.</i> [16]
Country	USA	USA	UK	Belgium	USA	China	Germany
n	14	12	9	17	42	26	27
Age, median (IQR), years	73.5 (67.5–77.2)	75.0 (57.5–77.2)	73.0 (52.0–79.0)	72.0 (62.0–77.0)	71.5 (38.0–97.0)	69.0 (39.0–8.07)	NA
AKI, %	42.9	100.0	NA	82.3	94.0	34.6	NA
CKD, %	57.1	8.3	10.0	NA	28.6	10.0	44.0
DM, %	35.7	33.3	20.0	52.9	42.0	15.0	NA
FSGS, %	7.1	NA	0.0	NA	3.0	7.7	NA
ATI/ATN, %	78.6	100.0	100.0	NA	62.0	100.0	NA
AS, %	78.6	83.3	83.3	NA	85.0	69.2	NA
Endothelial injury, %	NA	0	16.7	0	14.0	11.5	NA
Positive	2/4 IHC	0/12 IHC	NA	10/17 virus	0/10 ISH	3/6 IF	Unclear

Entender a interação entre o vírus e a atividade das proteínas que compõe estas junções pode contribuir para a compreensão do mecanismo utilizado pelo vírus para a quebra da barreira endotelial e consequente alcance sistêmico da infecção (Raghavan S. *et al.*, 2021).

MÉTODOS

3.1 APROVAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa humana da Pontifícia Universidade Católica do Paraná sob parecer nº 4.108.267.

As famílias permitiram a biópsia post-mortem dos casos do grupo de estudo com infecção confirmada por COVID-19 e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2 AMOSTRAS

As amostras do grupo controle compreendem peças cirúrgicas de pacientes que foram submetidos a procedimento cirúrgico no Hospital do Rim, na cidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram autorizados pelos pacientes mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O grupo de estudo foi denominado “grupo COVID” (n=18). Os dados clínicos e demais informações pertinentes ao internamento foram obtidas dos prontuários médicos durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Marcelino Champagnat em Curitiba, Brasil. O teste para COVID-19 foi realizado em esfregaços nasofaríngeos coletados durante a internação na UTI e a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) realizada para confirmação da infecção pelo SARS-CoV-2. A biópsia renal pós-morte minimamente invasiva foi realizada por meio de punção percutânea em flancos, com auxílio de agulha com dimensão aproximada de 14cm x 15 cm.

O grupo “Controle” (n = 22) foi constituído por amostras de pacientes pareadas em comorbidades e idade, em proporção de 1:1 a 2:1, obtidas por meio de peças cirúrgicas de pacientes submetidos a transplante renal no Hospital do Rim, localizado na cidade de São Paulo, estas amostras datam de procedimentos realizados pelo menos um ano antes do início da pandemia. Os resultados da avaliação histopatológica e imunohistoquímica foram comparados ao grupo COVID. O padrão para confecção de lâminas, tanto para a técnica de hematoxilina e eosina, quanto para imunomarcação e criação de imagens para cegamento dos pesquisadores e posterior análise, foi o mesmo aplicado no grupo de estudo.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os seguintes critérios foram definidos para inclusão de pacientes no estudo como “grupo COVID”:

- Ser considerado maior de idade pela legislação (idade maior ou igual a 18 anos)
- Admissão hospitalar por quadro clínico compatível com COVID-19: febre, dispneia ($\text{SaO}_2 < 92\%$) e/ou tosse
- Testes imunológicos ou moleculares confirmando a infecção pelo COVID-19 com ou sem coinfeções.

Foram excluídos do estudo pacientes que, apesar de apresentarem todos os itens descritos acima demonstraram exames negativos (PCR, sorologias) para COVID-19.

3.3 ENSAIOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

As amostras foram fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) e coradas com hematoxilina e eosina — H&E (Harris Hematoxilina: NewProv, Cod. PA203, Pinhais, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. Pinhais, BR). A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para analisar a expressão tecidual de Conexina-43 (anticorpo policlonal de coelho; Ab235282; Abcam; Human, Rat, diluição 1: 400) foi usado como o anticorpo primário.

A validação do anticorpo e a diluição ótima foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o controle positivo recomendado, nestes casos, amostras humanas. O polímero secundário foi Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Cat # SPD-125, Spring Bioscience, CA, EUA. O resultado é confirmado pela positividade do controle positivo, amostra sabidamente positiva para um anticorpo específico alocado junto com as amostras do paciente. As lâminas imunocoradas foram escaneadas (Axion Scan.Z1 Scanner, Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) e, em seguida, o software ZEN Blue Edition (Zeiss, Alemanha) foi usado para gerar aleatoriamente dez campos de alta potência por caso (HPF = objetiva de 40x). A análise foi cega, uma vez que as imagens foram geradas aleatoriamente pelo software, sem interferência do investigador. A análise da imunomarcagem das imagens foi realizada pelo software Image-Pro Plus versão 4.5 (Média Cybernetics, Rockville, MD). Os valores obtidos do software foram submetidos à análise estatística.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos por frequências e percentuais. As comparações foram realizadas por meio de Teste T de Student para variáveis contínuas e Qui-quadrado para variáveis nominais. Todas as análises foram processadas no software STATA 14.0, com o nível de significância adotado de 5%.

RESULTADOS

Os dados demográficos tais como gênero, idade e comorbidades preexistentes, obtidos dos prontuários, foram analisados e demonstrados na tabela a seguir:

Tabela 1 - Dados demográficos e comorbidades dos pacientes de estudo.

Dado	Variável	Controle	COVID
Gênero	Masculino	50% (n=09)	62,5% (n = 10)
	Feminino	50% (n=09)	37,5% (n = 08)
Idade (anos)	média/mediana	51,4 / 56,5	74,5/ 78
	Mín-Máx	30-72	59-86
Comorbidades	Diabetes Mellitus	38% (n = 07)	27% (n = 05)
	Hipertensão arterial sistêmica	44% (n = 08)	66% (n = 12)

Fonte – autor

Na análise imunohistoquímica das amostras, observou-se uma redução na expressão de conexina-43 quando comparadas ao grupo de controle. Abaixo, demonstra-se a tabela dos dados obtidos:

Tabela 2 – Descritivo estatístico da expressão de Conexina-43

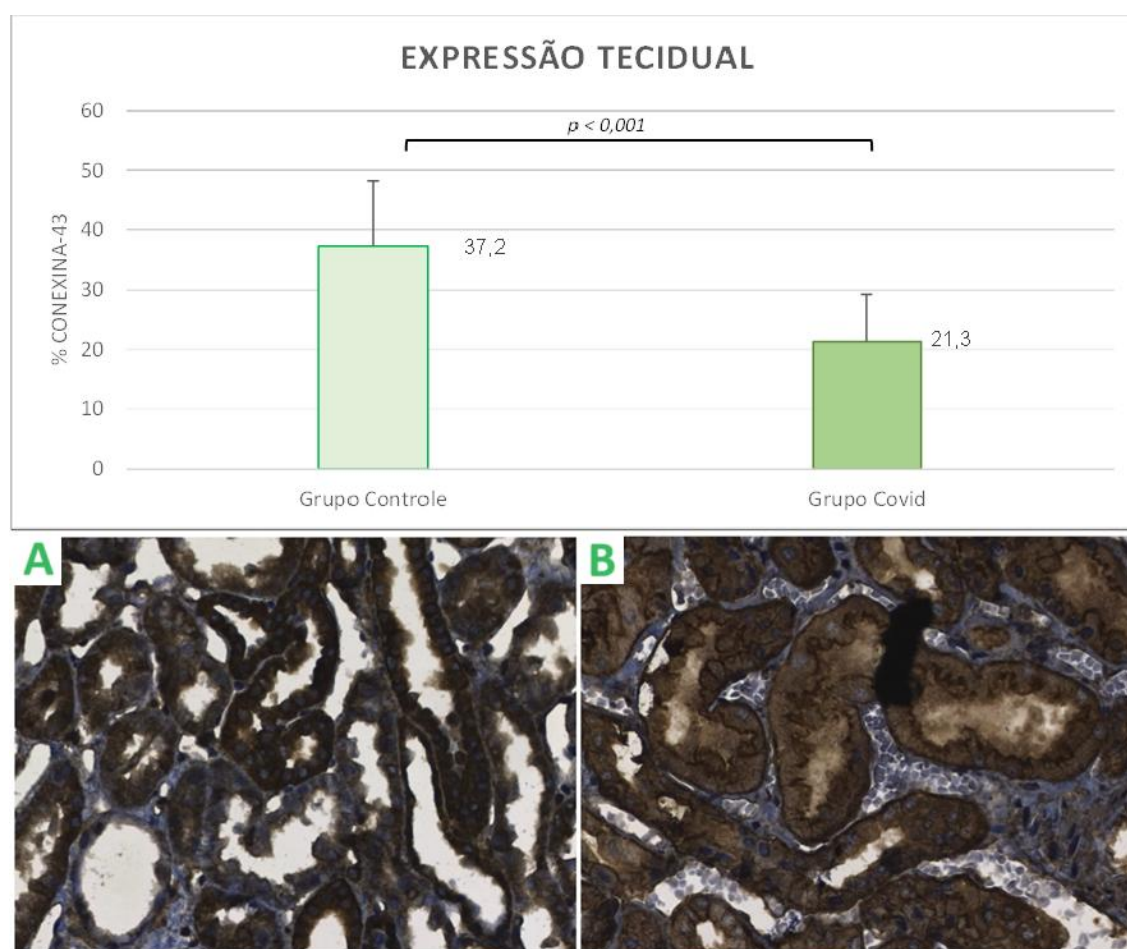
DESCRIPTIVO	GRUPO	% CONEXINA-43
N	grupo Controle	22
	grupo COVID	18
MÉDIA	grupo Controle	37.2
	grupo COVID	21.3
DESVIO PADRÃO	grupo Controle	11.8
	grupo COVID	9.72

Fonte - autor

O grupo controle, composto por 22 amostras, teve uma expressão de conexina-43 média de 37,2%. Enquanto o grupo de pacientes com COVID, composto por 18 amostras, teve uma expressão de conexina-43 média de 21,3 %. O desvio padrão encontrado para ambos os grupos foi próximo, 11,8% para o controle e 9,72% para o grupo de estudo. Dessa forma, a diferença média de expressão do marcador entre os dois grupos foi de 15,9 %.

Abaixo segue gráfico representativo da expressão e desvio padrão dos grupos:

Figura 2 - Expressão tecidual de Conexina-43; exemplos de cortes histológicos de grupo controle e grupo COVID.



Legenda: Gráfico representativo do resultado estatístico obtido por teste T de Student com valor de p considerando significância estatística $<0,05$. A- Reação imunohistoquímica com anticorpo anti-Conexina-43 em amostra do grupo controle. B- Reação imunohistoquímica com anticorpo anti-Conexina-43 em amostra do grupo Covid. Imagem obtida utilizando o scanner de lâminas da Zeiss AxioScan em objetiva com aumento de 40x.

DISCUSSÃO

Diante do cenário gerado pelo vírus SARS-CoV-2, que provocou uma catástrofe sanitária sem precedentes na civilização do século XXI, a busca por conhecimento sobre o vírus tornou-se essencial. Isso visa identificar fragilidades e potenciais alvos terapêuticos. Nesse

contexto, estudar proteínas envolvidas no processo inflamatório surgiu como uma opção promissora, com a conexina-43 sendo o foco principal deste estudo. (Li Q *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Durante processos inflamatórios, o que se observa é um aumento da expressão de conexina-43 na área afetada. A expressão de conexina-43 é estimulada por HIF1 α , o fator induzível por hipóxia. As conexinas são proteínas componentes das junções celulares comunicantes célula-célula e dentre outros tecidos, é ricamente expressa nos rins. Ela está envolvida na condução vascular, sinalização por cálcio e em mecanismos regulatórios. (HANNER *et al.*, 2010). De maneira geral, a Conexina-43 também aparece altamente expressa em células endoteliais neoformadas por angiogênese. (BRISSET; ISAKSON; KWAK, 2009).

Já é bem estabelecida a evolução de hipóxia em ambientes inflamados principalmente por conta da lesão celular e ativação endotelial, e para tanto esperava-se um aumento da expressão de conexina-43 no ambiente renal, a semelhança do que foi observado no ambiente pulmonar nas amostras destes pacientes que evoluíram para óbito por COVID-19. (CHANSON *et al.*, 2005)

Estudos em pacientes com doença renal crônica, uma doença inflamatória promotora de isquemia de longo prazo, também demonstraram aumento na expressão de conexina-43, provavelmente induzida por hipóxia. (TURNER *et al.*, 2004). Dessa forma, esperava-se que no ambiente renal a conexina-43 também apresentasse superexpressão tecidual, já que tal aumento foi observado nas amostras pulmonares. Entretanto, a imunoexpressão tecidual desta proteína nas amostras do presente estudo se mostrou 15,9% maior no grupo controle em relação ao grupo experimento.

Tendo em vista as amostras pulmonares dos pacientes deste estudo, com aumento significativo na imunoexpressão tecidual de conexina-43 e a visível angiogênese evidenciada neste ambiente, publicada anteriormente pelo grupo de pesquisa, acreditava-se que este padrão se repetiria no ambiente renal.

Esta diminuição pode estar relacionada às consequências renais descritas da Covid-19. Um estudo de 2020 sugeriu que a necrose tubular aguda (NTA) isquêmica é a principal causa de lesão renal aguda (LRA) na COVID-19, correspondendo a 66% dos casos ocorrendo principalmente como resultado da hipotensão e de uma prolongada depleção de volume. (MOHAMED *et al.*, 2020). O vírus causador da doença Covid-19, o SARS-CoV-2, usa a proteína transmembrana ECA-2 para invadir o ambiente intracelular, e as células renais

parecem apresentar uma alta expressão desta proteína, fazendo delas potenciais hospedeiras do vírus e provavelmente contribuindo para a inflamação local, hipóxia e por fim a necrose tubular. (PAN *et al.*, 2020).

O resultado encontrado foi oposto ao esperado tendo em vista todas as condições citadas acima. Todavia, a necrose tubular aguda promovida pela infecção pelo SARS-CoV-2 pode ser uma hipótese, já que a morte celular intensa do ambiente tubular renal impediria a expressão tecidual desta proteína. Além disso, o grupo controle não é composto por tecido renal saudável, e sim de pacientes com comorbidades associadas à piora do quadro de infecção da Covid-19 e foram pareados com o grupo de estudo. Isto também pode estar relacionado a este resultado, já que a comorbidade pode gerar hipóxia mais leve, sem evolução para necrose tubular e, portanto, não gerando morte celular, possibilitando a resposta de angiogênese.

CONCLUSÃO

As infecções virais do trato respiratório compreendem uma das principais causas de morbi-mortalidade no mundo. O SARS-CoV-2 se mostrou um vírus que produz infecção sistêmica, além do trato respiratório, tendo potencial para evoluir com dano em outros tecidos além do pulmonar. Os prejuízos no sistema nefrourológico foram sentidos nos pacientes que evoluíram com doença grave. Conhecendo a expressiva angiogênese pulmonar na infecção da Covid-19, acreditava-se num perfil semelhante no tecido renal.

O presente estudo concentrou-se na resposta celular à hipóxia gerada pelo ambiente inflamatório, caracterizada pela expressão tecidual aumentada de Conexina-43. No entanto observamos uma diminuição desta expressão em comparação com o grupo controle. Este dado poderia ser explicado pela lesão intensa gerada por hipóxia expressiva evoluindo com necrose tubular e, portanto, diminuindo a expressão de Conexina-43. Além disso, é necessário considerar que o grupo controle naturalmente poderia ter expressão aumentada desta proteína, já que se trata de pacientes com enfermidades consideradas comorbidades na infecção por Covid-19.

Esse resultado, embora diferente do esperado, possibilita a compreensão da lesão renal causada pela infecção grave pelo SARS-CoV-2 com desfecho óbito, auxiliando na compreensão da fisiopatologia desta doença além de garantir campo para a elaboração de novos estudos e possíveis alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

1. 2009 H1N1 Pandemic (H1N1pdm09 virus). Centers for Disease Control and Prevention; 2019.
2. BELL, S. et al. COVID and the Kidney: An Update. 2024.
3. BEYER, E. C.; Berthoud, V. M. Gap junction gene and protein families. 2018.
4. BREHMER Laura Cavalcanti de Farias, Trindade Letícia de Lima, Ramos Flávia Regina de Souza, Pires Denise Elvira Pires de, Santos Silvia Maria Azevedo dos, Meirelles Betina Hörner Schlindwein. Revisão integrativa da literatura sobre a influenza AH1N1. Texto contexto - enferm. 2011.
5. BRISSET, A. C.; ISAKSON, B. E.; KWAK, B. R. Connexins in Vascular Physiology. 2009.
6. CHANSON, M. et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. 2005.
7. HANNER, F. et al. Connexins and the kidney. 2010.
8. HERENDEEN, N. E., and P. G. Szilagyi. 2000. "Infections of the Upper Respiratory Tract." In Nelson Textbook of Pediatrics, 16th ed., edited by R. E. Behrman, R. B. Kliegman, and H. B. Jenson, pp. 1261–6. Philadelphia, PA: W.B. Saunders.
9. Hillis, GS. et al. Upregulation and co-localization of connexin43. 1997.
10. KLOMJIT, N. et al. COVID-19 and Glomerular Diseases. 2023.
11. LI Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. New England Journal of Medicine. 2020;382(13):1199–207.
12. MA, Z. et al. Endothelial contribution to COVID-19. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2022.
13. MOHAMED, M. M. B. et al. Acute Kidney Injury Associated with COVID-19. 2020.
14. OUDIT GY, Kassiri Z, Jiang C, Liu PP, Poutanen SM, Penninger JM, et al. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. European Journal of Clinical Investigation. 2009;39(7):618–25.
15. PAN, X. WU et al. Acute kidney injury during COVID-19 outbreak. 2020.
16. PRAKOURA, N.; Kavvadas, P.; Chadjichristos, CE. Connexin 43. 2018.
17. PRICE, GW. et al. Blocking Connexin-43 mediated hemichannel activity. 2020.
18. QIAN, Y. et al. Direct Activation of Endothelial Cells by SARS-CoV-2. Journal of Virology, 2021a.

19. QIAN, Y. et al. Direct Activation of Endothelial Cells by SARS-CoV-2. *Journal of Virology*, 2021b.
20. RAGHAVAN S, Kenchappa DB, Leo MD. SARS-CoV-2 Spike Protein. 2021.
21. SCHNYDER-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. 2006.
22. SHARMA, P. et al. Pathology of COVID-19-associated acute kidney injury. 2021.
23. TURNER, M. S. et al. Connexin 43 dephosphorylation. 2004.
24. VARGA Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*. 2020;395(10234):1417–8.
25. VASSILIOU AG, Keskinidou C, Jahaj E, Gallos P, Dimopoulou I, Kotanidou A, Orfanos SE. Endothelial Biomarkers. 2021.
26. WANG L, Zhang Y, Zhang S. Cardiovascular Impairment in COVID-19. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2020;7.
27. WHO IHR Emergency Committee for COVID-19 outbreak: hundred fourth report. World Health Organization, 2020.
28. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 13 April 2020. World Health Organization.
29. ZHANG, M.; Wang, Z. Z.; Chen, N. H. Connexin 43 Phosphorylation. 2023.