



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MARIA BEATRIZ CALADO DA SILVA

PAPEL DO PERFIL INFLAMATÓRIO E CELULAR NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2 E NO CURSO CLÍNICO DA COVID-19: uma abordagem *in silico*

Recife

2021

MARIA BEATRIZ CALADO DA SILVA

PAPEL DO PERFIL INFLAMATÓRIO E CELULAR NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2 E NO CURSO CLÍNICO DA COVID-19: uma abordagem *in silico*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella
Coorientadora: Dr^a. Almerinda Agreli

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Maria Beatriz Calado da

Papel do perfil inflamatório e celular na infecção por SARS-CoV-2 e no curso clínico da COVID-19: uma abordagem *in silico* / Maria Beatriz Calado da Silva - 2021.

63 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sergio Crovella

Coorientadora: Almerinda Agrelli

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. SARS-CoV-2 2. COVID-19 3. Inflamação

I. Crovella, Sergio (Orientador) II. Agrelli, Almerinda (Coorientadora)
III. Título

571.992 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-209

MARIA BEATRIZ CALADO DA SILVA

PAPEL DO PERFIL INFLAMATÓRIO E CELULAR NA INFECÇÃO POR SARS-COV-2 E NO CURSO CLÍNICO DA COVID-19: uma abordagem *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

.

Aprovado em: 01/07/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Sergio Crovella (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wilson José da Silva Júnior
Universidade Federal de Pernambuco

À todas as mulheres que lutaram para a construção de uma sociedade mais
igualitária

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao querido professor Sergio Crovella, a quem eu sou imensamente grata pela oportunidade. É um privilégio inenarrável ter como orientador um cientista tão brilhante. O senhor sempre será uma fonte de inspiração para mim e tantos outros jovens pesquisadores.

Aos meus co-orientadores, Almerinda Agreli e Ronald Moura, por todos os ensinamentos e principalmente pelo tempo que vocês desprenderam para auxiliar no meu desenvolvimento profissional. O apoio e amizade de ambos foi crucial para a finalização desta etapa. Tentei construir um altar no meio da UFPE em homenagem a vocês, mas infelizmente não foi possível.

As minhas colegas de laboratório, Ana Sofia, Giovanna Bloise e Natália Silva, que me acolheram prontamente e me proporcionaram momentos tão divertidos em meio a este caos. Um agradecimento especial ao Lucas Bernardo, por ter sido um elo entre mim e os demais integrantes do lab mas, acima de tudo, pelo fortalecimento da nossa amizade. Não tenho palavras pra dizer o quanto você foi, e é, importante pra mim.

À banca examinadora, que se dispôs a colaborar com a melhoria do presente trabalho e por contribuir para a minha educação em momentos diferentes e de formas tão distintas.

Ao meu companheiro de vida, Neto Rodrigues, pelo amor incondicional e por todo o suporte. Para a minha sorte, você sempre foi meu maior admirador e eu sou muito feliz em ter alguém tão bondoso para compartilhar os melhores (e piores) momentos comigo. O seu carinho e cuidado me dão forças para seguir em frente.

À Clara Maas, por ser o melhor presente que a UFPB me proporcionou. Obrigada por todas as fofocas compartilhadas e por tantas outras coisas que nós dividimos. Os 2.574 km que estão entre nós é apenas distância teórica porque, na prática, eu nunca estou sozinha.

Aos meus amigos da graduação que estão espalhados pelo mundo, mas que continuam presentes. Felipe Jordão, Beatriz Lopes, Débora Lemos, João Gabriel, Matheus Fabião e Brenno Fernandes, vocês são os melhores!

À minha mãe e minha avó, por serem mulheres maravilhosas e que me fizeram ser quem eu sou. Muito obrigada por todo o amor, cuidado, puxões de orelha e apoio.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

- Sir Isaac Newton

RESUMO

Em junho de 2021, quinze meses após o reconhecimento da pandemia de COVID-19 pela organização mundial da saúde (OMS), o mundo ultrapassou 180 milhões de casos e quase quatro milhões de óbitos. Este elevado número de mortes está associado ao processo inflamatório intenso, sabido como um fator determinante no desenvolvimento da COVID-19. Embora seja conhecido diversos mediadores e moléculas participantes desta inflamação, o papel do complexo do inflamassoma nesse contexto ainda é pouco conhecido e explorado. Ademais, as peculiaridades entre os indivíduos precisam ser documentadas e discutidas, e as moléculas que estão envolvidas nesse processo, melhor caracterizadas. Para essa finalidade, as diferentes técnicas multi-ômicas representam uma abordagem relevante na determinação de fatores genéticos do indivíduo que interferem na susceptibilidade a doença visto que, enquanto alguns indivíduos infectados são assintomáticos ou apresentam apenas sintomas leves, outra parcela desenvolve quadros severos. Buscando determinar as diferenças entre pacientes com COVID-19, foram utilizados dados de transcriptoma disponíveis no GEO dataset. De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos, três estudos foram selecionados para compor o presente trabalho. A partir da meta-análise, a quantificação dos genes diferencialmente expressos foi realizada, seguida da análise de enriquecimento de tais genes através do Gene Ontology. Posteriormente, a definição das vias de sinalização correspondentes aos DEGs foi executada utilizando a ferramenta Reactome. Aqui, observou-se o aumento da expressão de quimiocinas fundamentais na condução da resposta imunológica. Também foi possível perceber o aumento de genes envolvidos na sinalização do interferon como IFI27, IFI44L e IFIT3, além de genes importantes para a resposta antiviral, como OAS3, GBP1 e TRIM6. Entretanto, não foi identificado a presença de genes atrelados ao inflamassoma. Adicionalmente, os termos obtidos com o GO expõem a presença de vias do ciclo celular acentuada em pacientes com COVID-19. Tal resultado pode auxiliar no entendimento das particularidades genéticas dos pacientes com COVID-19, e relata perfil desses indivíduos em uma determinada fase da doença. Assim sendo, é possível a racionalização de novas abordagens terapêuticas

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; Inflamação; IL-1b; Interferon.

ABSTRACT

In June of 2021, fifteen months after the World Health Organization (WHO) had recognized the COVID 19 pandemic, the world reached more than 170 million COVID-positive cases and more than 4 million lives were lost to the disease. It is known that the inflammatory process plays a key role on the development of the COVID severe cases and therefore the role of inflammasomes needs to be addressed. Furthermore, the heterogeneity of COVID phenotype according with people's individuality still needs to be collected, discussed, and the molecules as well as pathways associated better characterized. To overcome this gap, the utilization of multi-omics techniques represents an innovative approach to determine genomic factors associated to the disease susceptibility as well as identify new therapeutical targets. Other than that, some people can develop an asymptomatic or even mild symptom form or could develop into an aggressive form characterized by the presence of severe symptoms. Patients with severe form of COVID disease can display some disturbances on coagulation pathway and/or develop acute respiratory distress syndrome (ARDS) which may evolve to patient death. In order to determine differences among COVID patients, public transcription data from GEO dataset were used. According to the inclusion criteria, three studies were selected for this work. After the meta-analysis, the quantification of differentially expressed genes were made, followed by gene set enrichment analysis using Gene Ontology (GO). Subsequently, the definition of signaling pathways regarding to DEGs were performed using Reactome. Here, were observed the increased levels of chemokines, such as CCL2, CCL8 and CXCL1, fundamental to conduct the immune response. Also, were possible to detect the upregulation of genes involved on interferon signaling pathway, as IFI27, IFI44L and IFIT3, and some genes important to antiviral response such as OAS3, GBP1, and TRIM6. ADC, the terms founded on GO also demonstrates the notable interferon presence in COVID-19 patients. These results could help to understand the genetic particularity among patients and describe the profile in a specific phase of the disease. Therefore, it is possible rationale about new therapeutic approaches.

Key-words: SARS-CoV-2; COVID-19; Inflammation; IL-1b; Interferon.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivos gerais.....	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	SARS-CoV-2: BIOLOGIA E PATOGENICIDADE.....	14
2.2	INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO.....	18
2.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	19
2.4	RESPOSTA DE INTERFERONS.....	23
2.5	INFLAMASSOMA.....	25
2.5.1	Inflamassoma e sua interferências nos sintomas da COVID-19.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	AQUISIÇÃO DOS DATASETS	33
3.2	CONTROLE DE QUALIDADE.....	33
3.3	TRIMAGEM.....	35
3.4	INDEXAÇÃO DO GENOMA DE REFERÊNCIA.....	35
3.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GENÔMICA DIFERENCIAL.....	36
3.6	ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DOS TERMOS.....	36
3.7	REACTOMA.....	37
3.8	META-ANÁLISE.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	INCLUSÃO DOS DATASETS.....	38
4.2	REVISÃO SISTEMÁTICA.....	40
4.3	META-ANÁLISE.....	41
4.3.1	Genes diferencialmente expressos.....	41
4.3.2	Gene ontology.....	42
4.3.3	Reactome.....	44
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Durante o curso da história humana, diversas doenças foram responsáveis por afetarem civilizações inteiras. Ao longo das últimas décadas, vírus patogênicos foram responsáveis por epidemias que fizeram milhões de vítimas (PIRET; BOIVIN, 2021). Atualmente, a crise sanitária resultante da pandemia de COVID-19 promoveu diversas mudanças que alteraram eixos centrais da nossa sociedade. As estimativas de R_0 (*Número Básico de Reprodução*, pronunciado “R zero”), indicador que mede a transmissibilidade viral, para o SARS-CoV-2 variam de 2,43 a 3,10 (D’ARIENZO; CONIGLIO, 2020). Isso significa que uma pessoa infectada transmite o vírus para mais duas ou três pessoas. Devido a essa alta de transmissão, em aproximadamente 18 meses, o SARS-CoV-2 infectou 162.673.131 pessoas e foi responsável por mais de 3 milhões de óbitos (DONG, E.; DU, H.; GARDNER, 2020).

Além da elevada incidência, a escassez de dados científicos sobre a fisiopatologia da doença tem dificultado o desenvolvimento de protocolos de manejo clínico, o que tem contribuído para o colapso de sistemas de saúde ao redor do mundo (VIJAYVARGIYA *et al.*, 2020).

A sintomatologia da COVID-19 varia entre assintomático, leve (ausência de pneumonia ou pneumonia leve), severo (dispneia, frequência respiratória $\geq 30/\text{min}$, saturação de oxigênio $\leq 93\%$, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ e/ou infiltrado pulmonar $>50\%$ em 24/48 horas) e crítico (falência respiratória, choque séptico e/ou falência múltipla de órgãos) (WU, Z.; MCGOOGAN, 2020). Essa heterogeneidade clínica dificulta o estabelecimento de protocolos de diagnóstico, manejo clínico e terapêutico. Ademais, fatores genéticos e moleculares do hospedeiro parecem influenciar diretamente na evolução dos quadros, alguns desenvolvendo uma resposta imunológica adequada e eficaz (que leva ao *clearance* do vírus e resolução do caso), e outros evoluindo para óbito, mesmo com acompanhamento e tratamento similares (CARMO *et al.*, 2020; TAN, A. T. *et al.*, 2021).

Dentre os fatores atrelados a um pior prognóstico, a desregulação do sistema imunológico tem sido o mais mencionado, visto que os casos mais graves apresentam uma exacerbada resposta inflamatória com severo dano tecidual (CHEN, Yan-Mei *et al.*, 2020; LAI, A. L. *et al.*, 2020). Nesse contexto, o fenômeno conhecido por “tempestade de citocinas”, caracterizado por uma hiperinflamação sistêmica em decorrência da liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, tem sido

amplamente estudado, principalmente a citocina IL-6, considerada a mais relevante relacionada a este processo (HEROLD *et al.*, 2020). Não obstante, a IL-1 β , uma citocina fundamental no estabelecimento do processo inflamatório e na resposta imune inata foi reportada por induzir um feedback positivo, aumentando ainda mais a liberação de IL-1 β , induzindo o complexo do inflamassoma e morte celular por piroptose (GIRIJA; SHANKAR; LARSSON, 2020; WANG, J. *et al.*, 2020).

Após a entrada do vírus nas células, inicia-se uma resposta imunológica localizada na tentativa de debelar a infecção. O próprio reconhecimento da partícula viral por receptores específicos e os processos desencadeados pela entrada do vírus (como injúria às células endoteliais e piroptose) promove a liberação de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), os quais são reconhecidos por receptores de conhecimento padrão (PRR) e promovem diferentes cascatas de sinalização (AMARANTE-MENDES *et al.*, 2018; ROH; SOHN, 2018).

Os toll-like receptors (TLR) são receptores extracelulares que reconhecem PAMPs e atuam engatilhando a resposta inflamatória através da indução de moléculas, como o NF κ -B que, por sua vez, atua promovendo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, os NOD-like receptors (NLR) reconhecem DAMPs no meio intracelular e ativam a via do inflamassoma ativando pró-IL-1 β e pró-IL-18 (ANWAR *et al.*, 2019; PLATNICH; MURUVE, 2019).

Os interferons (IFNs) tipo I, II e III exercem um papel crítico na resposta antiviral do hospedeiro (BUSNADIEGO *et al.*, 2020). Embora controversos, achados de níveis aberrantes de IFNs já são correlacionados com as formas graves de COVID-19. Embora as vias de IFN sejam complexas e dinâmicas, é possível observar flutuações dos níveis de diferentes tipos de IFN em diferentes estágios da doença. Além disso, o IFN sofre interferência de outras citocinas e moléculas através de redes de interação multifacetadas e não lineares. Portanto, é fundamental elucidar como os interferons se comportam em diferentes grupos de pacientes e entender sua correlação (CONTOLI *et al.*, 2021; HADJADJ *et al.*, 2020).

Ao que tudo indica, a patogênese da COVID-19 é ocasionada primordialmente por fatores intrínsecos do hospedeiro e não apenas pelo vírus *em si*. Além da inflamação, diversos fatores já foram descritos como sendo capazes de influenciar no agravamento dos pacientes, como a proporção entre neutrófilos e linfócitos, carga viral, dímero D e baixos níveis de plaquetas. Entretanto, ainda permanece a incerteza

sobre a abrangência desses fatores e como eles se sobrepõem (FU, J. *et al.*, 2020; LI, X. *et al.*, 2020). Logo, especificar as diferenças imunológicas e caracterizar o padrão de expressão gênica pode auxiliar no preenchimento destas lacunas.

Nesse contexto, a utilização de ferramentas multi-ômicas torna-se uma estratégia precisa, robusta e capaz de gerar um grande volume de dados que reflete um profundo conhecimento sobre determinado evento. Devido à pandemia, muitos grupos de pesquisa tornaram públicos seus dados brutos, o que possibilita este tipo de análise (AGGARWAL *et al.*, 2021; RIOS; ZHENG, K. I.; ZHENG, M.-H., 2020; WOLKEWITZ; PULJAK, 2020).

Tendo em vista a complexidade das respostas imunológicas, estudos específicos que investiguem diferentes variáveis, moléculas e suas interações em múltiplas vias de sinalização, são necessários para um melhor entendimento sobre o SARS-CoV-2 e sua patogênese. Nesse trabalho, objetivamos caracterizar o perfil de transcriptoma de pacientes com COVID-19 e determinar a interferência da via do inflamassoma na severidade dos sintomas clínicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de transcriptoma de pacientes com COVID-19 e determinar a interferência da via do inflamassoma na severidade dos sintomas clínicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a interferência do inflamassoma no desenvolvimento COVID-19;
- Identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) relacionados com a severidade da doença;
- Definir as vias de sinalização majoritariamente ativadas em pacientes COVID-19.

2. REVISÃO DA LITERATURA

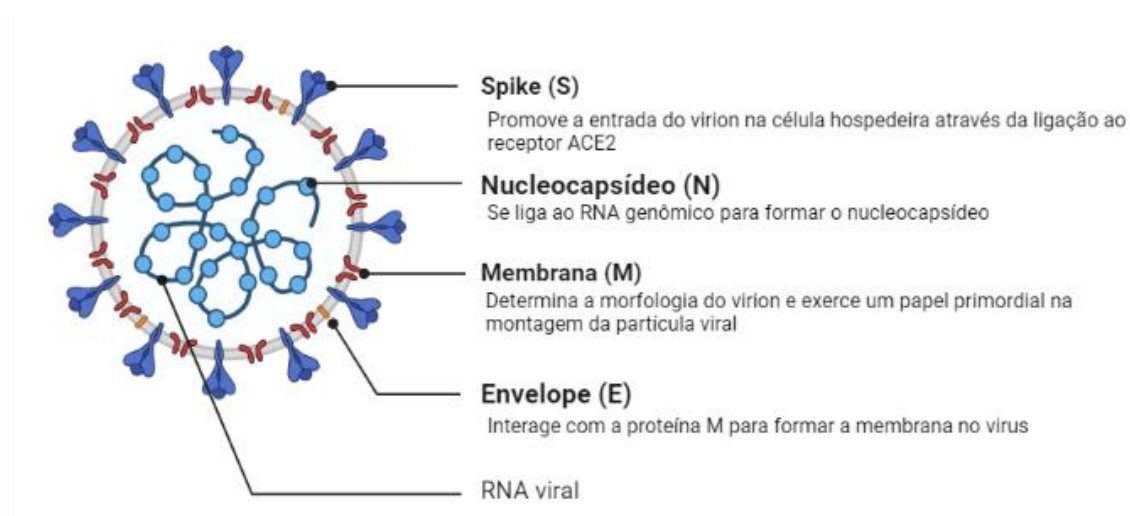
2.1 SARS-CoV-2: BIOLOGIA E PATOGENICIDADE

Como consequência do contato humano-para-humano e do grande volume de viagens intercontinentais, uma doença zoonótica previamente desconhecida espalhou-se por diversos países em pouco mais de um mês após a detecção dos primeiros casos, em dezembro de 2019. Embora apresente uma letalidade menor que o SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2, agente causador da pandemia de COVID-19, apresenta uma alta transmissibilidade (HARRISON; LIN, T.; WANG, P., 2020).

Em resposta à esta emergência, o genoma do vírus foi rapidamente analisado e definido como sendo pertencente à família *Coronaviridae* e ao gênero *Betacoronavirus*. Os resultados indicaram também o índice de 79,5% de similaridade com o SARS-CoV, 50% com a MERS e 96% com a linhagem BatCov RaTG13 (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 é formado por 14 fases/quadros de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frame*) responsáveis pela codificação de proteínas não-estruturais e acessórias, além de quatro proteínas estruturais. As ORF1a e ORF1b compreendem 2/3 do genoma. A última porção do genoma é responsável pela codificação das proteínas estruturais S, E, M e N, comuns a outros coronavírus (WANG, M. Y. *et al.*, 2020) (**Figura 1**).

Figura 1 – Representação esquemática do SARS-CoV-2



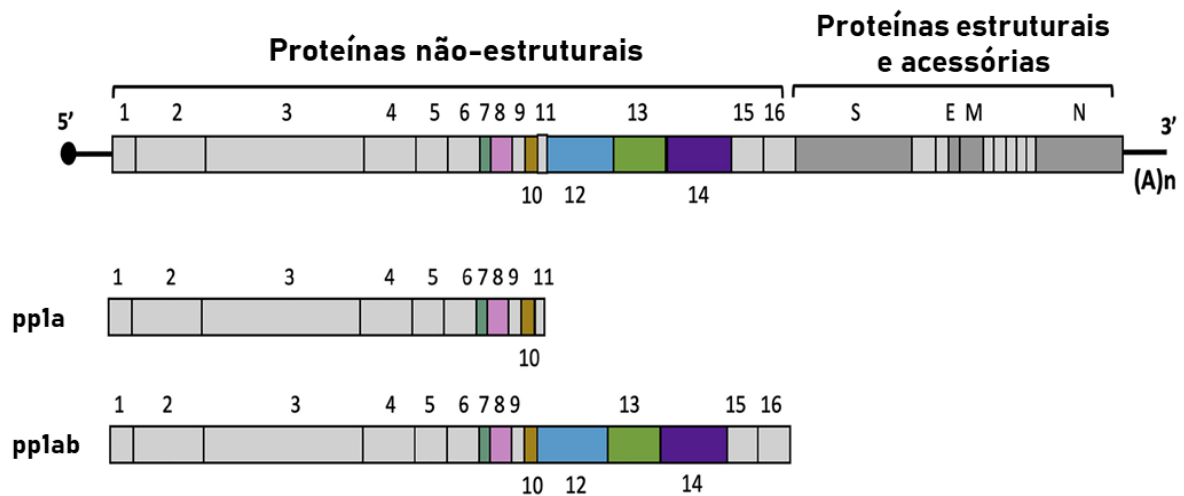
Fonte: Autora (2021)

Dentre estas, a proteína Spike (S) é a mais bem documentada até o momento, devido a sua função de promover a entrada do vírus no hospedeiro. Essa proteína de superfície é responsável pelo reconhecimento e ligação ao receptor ACE2. A afinidade do vírus pelo receptor no hospedeiro é um fator fundamental para a infectividade e o curso da doença, visto que essa ligação é o passo inicial da infecção (CALCAGNILE *et al.*, 2021; OZONO *et al.*, 2021; WALLS *et al.*, 2020).

Ainda em relação aos mecanismos de entrada na célula hospedeira, de forma sucinta, o processo pode ser descrito da seguinte forma: através da subunidade S1, também conhecida como domínio de ligação ao receptor (do inglês *Receptor Binding Domain*, RBD), é responsável pelo ancoramento do vírion na membrana do hospedeiro, iniciando a infecção. Durante esse processo, a proteína viral requer a presença de uma proteína do hospedeiro, a TMPRSS2, que cliva a proteína S nos sítios S1/S2 e S2'. Por fim, a subunidade S2 age efetivamente como proteína de fusão (HOFFMANN *et al.*, 2020).

Uma vez que o vírus já se encontra dentro da célula, os eventos subsequentes visam a replicação e posterior liberação de novas partículas virais. No citoplasma, o genoma viral age como um RNA mensageiro (mRNA) e o ribossomo do hospedeiro começa a tradução dos genes ORF1a e ORF1b, que são transcritos nas duas poliproteínas pp1a e pp1ab. Estas, então, sofrem clivagem proteolítica e são divididas em 16 proteínas não-estruturais (nsp), nomeadas de nsp1 a nsp16, envolvidas diretamente na replicação e transcrição do genoma viral (ROBSON *et al.*, 2020; SNIJDER *et al.*, 2003) (**Figura 2**).

Figura 2 – Arquitetura genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado (ROBSON *et al.*, 2020)

Esses processos são conduzidos através do complexo multi-proteína replicase-transcriptase (RTC) – composto por nsps e proteínas estruturais como a N e M – associado com uma rede de vesículas compostas por membranas de vesícula-dupla (DMVs) e por membranas convolutas (CVs), provenientes do retículo endoplasmático. As proteínas nsp3, nsp4 e nsp6 promovem a ancoragem da maquinaria de replicação na CVs, enquanto o dsRNA formado pelo processo de replicação-transcrição é majoritariamente contido no DMV, o que deixa aberta a possibilidade de isto ser um mecanismo de escape do sistema imunológico para minimizar a detecção de dsRNA (KNOOPS *et al.*, 2008).

A maquinaria de transcrição é composta por diversas proteínas funcionais, incluindo a RdRp/nsp12, helicase ligante de zinco (HEL, Nsp13), mRNA *capping* (Nsp14, Nsp16), RNA *proofreading* (Nsp14) e endorribonuclease específica de uridilato (nsp15). O processo transcricional como um todo exige proteínas não estruturais para além dessas citadas, como as nsp7, nsp8, nsp9 e nsp10. É importante salientar que todo este aparato está ancorado na superfície das membranas derivadas do retículo endoplasmático (FEHR, 2015) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Resumo das funções majoritárias das proteínas não-estruturais

Proteína	Função
Nsp1	Inibir sinalização de IFNs e degradar o mRNA do hospedeiro, bloqueando a tradução
Nsp2	Participar do complexo RTC, requerido para replicação/transcrição
Nsp3	Inibir a sinalização de IFNs e clivar as poliproteínas virais
Nsp4	Promover a formação das DMVs
Nsp5	Junto à nsp3, promove a clivagem das poliproteínas
Nsp6	Assim como a nsp3, contribui para a formação das DMVs
Nsp7 e Nsp8	Formam um complexo hexadecamérico que serve de cofator para a nsp12
Nsp9	Proteína que se liga ao ssRNA. Implicada no fator de virulência
Nsp10	Cofator para a nsp14 e nsp16
Nsp12	Compreende a enzima RdRp, indispensável para a replicação e transcrição
Nsp13	Helicase. Essencial para a replicação e bastante conservada entre os Coronavírus.
Nsp14	Possui duas atividades distintas, como exoribonuclease N-terminal 3'-a-5'(ExoN) e N7-metiltransferase C-terminal (N7-MTase).
Nsp15	Endoribonuclease responsável por clivar a porção 3'. Participa da evasão ao sistema imune
Nsp16	Cataliza o processo de capping da região 5'

Fonte: Autora (2021)

Além da interação perfeita entre todos os componentes dessa estrutura, há outras exigências para a eficiência dessa maquinaria, como a modulação da expressão gênica do hospedeiro e bloqueio da resposta imunológica. A nsp1, fundamental para a transcrição do genoma viral, é considerada como um dos maiores fatores de virulência dos coronavírus. Adicionalmente, a proteína N é responsável por proteger o genoma viral empacotando-o em um ribonucleocapsídeo helicoidal, além de se ligar ao RNA para torná-lo acessível para a maquinaria de replicação. A proteína N também interage com a proteína M, atuando na condensação do genoma e no empacotamento da partícula viral (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

Em seguida, a proteína M, através da sua interação com múltiplas proteínas, desencadeia a montagem do vírion, que consiste basicamente na incorporação do nucleocapsídeo, envelope e proteína spike na partícula viral. Posteriormente, o vírus será exocitado através de vesículas secretoras que se fundem com a membrana plasmática (HASÖKSÜZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020).

2.2 INTERAÇÃO PATÓGENO – HOSPEDEIRO

Algo inerente as infecções virais é a relação entre as proteínas do hospedeiro e as proteínas do vírus, visto que patógenos manipulam a maquinaria celular do organismo para conseguir vantagens em seu desenvolvimento. Essa interação é capaz de modular diferentes processos biológicos que interferem no curso clínico da doença, na efetividade de vacinas e na resposta terapêutica.

Essa interação pode se dar através de proteínas, sequências de nucleotídeos, pequenos ligantes e metabólitos. Independentemente da forma de interação, as proteínas virais vão agir de forma dinâmica para conseguir desempenhar o seu papel (DURMUS *et al.*, 2015). Apesar da indiscutível relevância promovida pela interação proteína-proteína, RNA não codificante (ncRNA) tem se apresentado como um agente significativo nos processos de correlação entre vírus e hospedeiro sendo, portanto, um alvo que requer estudos adicionais (HENZINGER *et al.*, 2020).

Dentre as desregulações que pode ocorrer ao hospedeiro, tem-se o aumento da expressão de proteínas envolvidas na tradução, transporte de vesículas, proteassoma, e modulação de vias secretórias, que são um dos primeiros processos alvo do vírus. Essa modificação no transporte de vesículas é importante para o ciclo de replicação do vírus. Todos esses pontos podem ser relevantes para o desenvolvimento de terapias antivirais visto que elucidar as moléculas e vias de sinalização que o vírus é capaz de cooptar é o pilar fundamental para pesquisas translacionais (MACHHI *et al.*, 2021; SANTERRE *et al.*, 2021).

Uma das formas que diferentes vírus utilizam para subverter processos celulares enquanto evadem as defesas do organismo, é a parada ou indução do ciclo celular das células infectadas, a depender do seu propósito. Da perspectiva de interações proteína-proteína, o complexo ciclina/CDK são um dos principais reguladores do ciclo celular, funcionando como relógios que, uma vez ativados, levam à progressão do ciclo. Devido a este protagonismo, esse complexo é alvo frequente de diferentes tipos de vírus. Estudos demonstram a capacidade de diferentes coronavírus em inibir este complexo e bloquear a progressão do ciclo celular para a fase S através de sua proteína N (SURJIT *et al.*, 2006), bem como a inibição do ciclo nas fases G0 e G1 (CHEN, C.-J.; MAKINO, 2004). Além disso, outros trabalhos apontam que outros vírus da família *Coronaviridae* possuem a habilidade de induzir o prolongamento da fase S através das proteínas N e M, além da indução do estresse

do retículo endoplasmático e aumento da expressão de IL-8 (XU, X. *et al.*, 2013; XU, X. G. *et al.*, 2015).

Não obstante, há outras formas de modulação do ciclo celular do hospedeiro. A resposta ao estresse celular está dentre as funções atribuídas ao gene p53, e isso engloba a parada do ciclo celular, mecanismos de reparo à danos no DNA e indução de apoptose. Isso deixa claro a magnitude das respostas envolvendo este gene e a necessidade de estudos detalhados capazes de englobar diversos aspectos da ativação e regulação da via p53 (DING, L. *et al.*, 2014; SU, M. *et al.*, 2020).

Em infecções virais o hospedeiro tende a induzir o processo de morte celular por apoptose como tentativa de frear o processo infeccioso. Os mecanismos específicos pelos quais isso ocorre variam de acordo com o tipo do vírus. Evidências indicam que o SARS-CoV-2 tem capacidade de induzir o processo apoptótico em diferentes tipos celulares, abrindo a possibilidade de consideração desta via como possível alvo terapêutico (FERREIRA *et al.*, 2021; LI, S. *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2020).

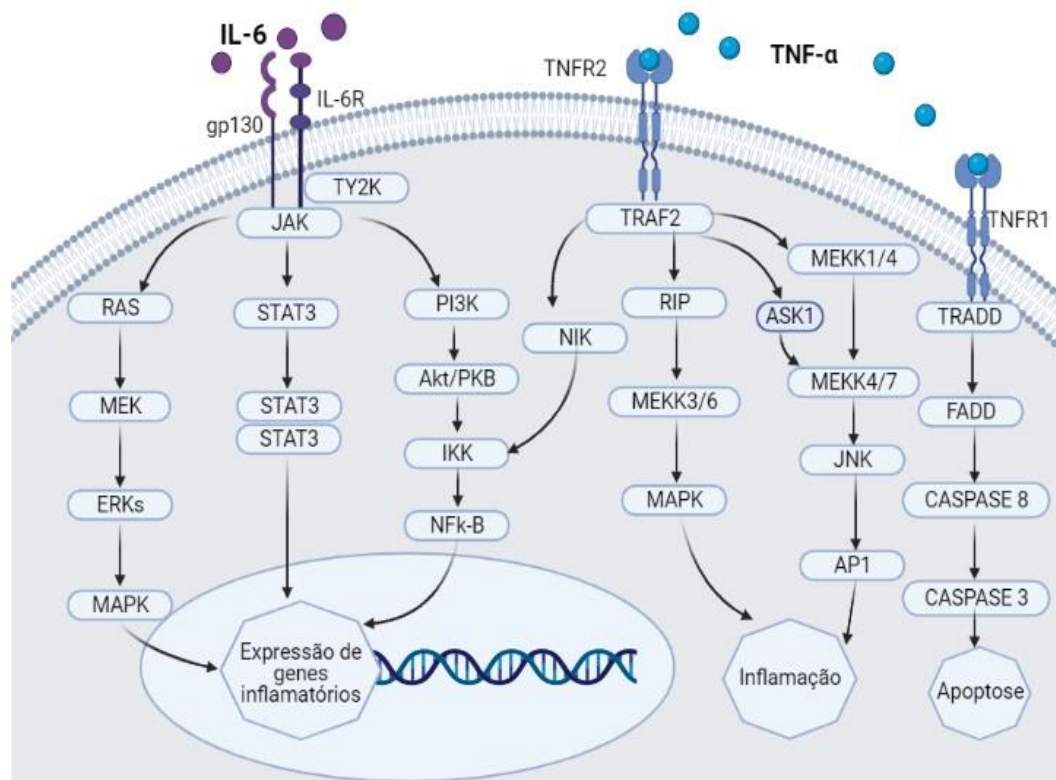
2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Os coronavírus são conhecidos por causarem doenças em animais e em humanos (DONNIK *et al.*, 2021). Dentre todas as linhagens, algumas já são bastante conhecidas por infectarem o trato respiratório e desencadearem sintomas leves, referentes a uma gripe comum (PAULES; MARSTON; FAUCI, 2020). No entanto, dentre os coronavírus que fogem a esta regra e podem ser fatais, o SARS-CoV-2 promove uma resposta similar ao SARS-CoV e causa uma inflamação agressiva que gera danos as vias aéreas (SCHAEFER *et al.*, 2020).

Diversos eventos interdependentes são necessários até o momento em que a o desbalanço da resposta imunológica efetivamente ocorre. Primeiro, a entrada do vírus na célula hospedeira estimula a resposta imune inata, uma vez que o vírus apresenta estruturas específicas categorizadas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são reconhecidas por receptores de reconhecimento padrão (PRR). Atualmente, tem-se a descrição de algumas classes de PRRs, como o receptor tipo RIG (RLR), receptor tipo toll (TLR), receptores de lectina tipo C, proteína quinase ativada por RNA (PKR) e receptor tipo NOD (NLR) (PACES *et al.*, 2020).

Baseado na ativação de PRRs específicos, ocorre a ativação de diversas vias de sinalização que visam conter os danos promovido pelo patógeno. Por exemplo, o TLR4 pode reconhecer a parte exterior de coronavírus através da spike e mediar a ativação de MYD88 e NF- κ B. Em contrapartida, o TLR3, um receptor endossomal, reconhece o RNA ou dsRNA e recruta o TRIF, uma proteína adaptadora que ativa o IRF3 e NF- κ B (VIDYA *et al.*, 2018). Por conta da sua complexidade e relevância para o curso clínico da COVID-19, a resposta aos interferons será discutida posteriormente neste trabalho. Uma vez ativado, NF- κ B promove a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (**Figura 3**). Apesar de possuir uma atribuição indispensável ao organismo, quando em excesso, essas citocinas inflamatórias promovem um desbalanço acentuado e podem levar ao desenvolvimento da Síndrome da Dificuldade Respiratória Aguda (SDRA) (do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) (PAIN *et al.*, 2020).

Figura 3 – Via de sinalização das citocinas IL-6 e TNF- α



Fonte: Autora (2021)

Em linhas gerais, após a interação PAMP-PRR, ocorre a ativação de cascatas que envolvem o MYD-88 para a indução de IFN-I, seguido da estimulação do NF- κ B

e, por fim, a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Nos pacientes afligidos ocorre o aumento da secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF, IL-1, MCP1, IFN- γ e IP-10, instaurando a inflamação no local (CROW; RONNBLOM, 2019).

Em paralelo, células apresentadoras de antígeno (APCs) utilizam o MHC I para apresentar o antígeno as células T CD4⁺ e adicionalmente, ocorre a liberação de IL-12 que age como co-estimulador para ativar as células do perfil Th1, gerando então um *feedback* positivo com liberação de mais IL-12. Essa citocina, juntamente com IFN- α , leva ao aumento da expressão de MHC I e ativação de células NK, importante para erradicar o vírus das células infectadas. Esse processo também pode iniciar a produção de citocinas pró-inflamatórias via NF-kB. Como uma resposta às funções individuais de cada uma das citocinas e quimiocinas que estão em níveis aumentados, ocorre o recrutamento de mais leucócitos para o local da infecção agravando o quadro hiper inflamatório (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

Até então é possível perceber que diferentes caminhos expandem a inflamação no hospedeiro, e que diversas vias são retroalimentadas positivamente, dificultando a interrupção desse ciclo. Estudos clínicos indicam que a severidade da COVID-19 está positivamente relacionada com os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IL-18, CCL3, entre outras (GHAZAVI *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2020) (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais atribuições das citocinas pró-inflamatórias

Citocina	Função	Referências
IL-1 β	Produzido por monócitos/macrófagos após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs por PRRs. É um marcador plasmático da inflamação, induz a vasodilatação e extravasamento de células imunológicas. Está envolvida no aumento de expressão da citocina pleiotrófica IL-6. Seu receptor pode ser encontrado em diferentes tipos de célula, incluindo monócitos, macrófagos, células B e T, células dendríticas (DCs) e células epiteliais.	(BORTHWICK, 2016; DINARELLO, 2018)
IL-2	Majoritariamente produzida por células T CD4, é um fator de crescimento e ativação autócrino para subpopulações de linfócitos T. É capaz de induzir a ativação e proliferação de células NK e ativar células B na presença de IL-4. A produção de IL-2 é regulada por sinais co-estimulatórios (como IFN- α e IL-1) e reconhecimento de antígeno. É um importante mediador da comunicação intracelular.	(SPOLSKI; LI, Peng; LEONARD, 2018; TAHVILDARI; DANA, 2019)
IL-6	Produzido por células T, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e monócitos após a infecção ou em inflamação estéril. Contribui para a regulação do metabolismo, regeneração hepática, ativação de células T e diferenciação de células B. É relevante para a regulação da fase aguda devido a indução de proteínas, incluindo haptoglobina, proteína C reativa, proteína amilóide A sérica, fibrinogênio e α 1-antitripsina. Os alvos para essa citocina são células B e T, basófilos, neutrófilos e eosinófilos.	(BARAN <i>et al.</i> , 2018; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2016)

IL-18	A forma ativa é secretada por macrófagos e DCs mas também é constitutivamente expressas em PBMC, macrófagos, queratinócitos, células epiteliais, osteoblastos e condrócitos. Desempenham um papel crucial na ativação de células hematopoiéticas e indução do IFN- γ Th1, Th2, DCs, e células T citotóxicas. É importante para a defesa intracelular contra patógenos através da produção de IFN γ e indução da resposta imunológica mediada por Th1. Desencadeia a resposta Th2 após induzir a produção de IL-4 e IL-13 em basófilos, mastócitos, células NK e células T.	(FENINI; CONTASSOT; FRENCH, 2017; REX <i>et al.</i> , 2020)
TNF- α	É indispensável para a imunidade e homeostasia celular. A forma ativa é majoritariamente secretada por macrófagos, mas pode ser produzida por queratinócitos, astrócitos, fibroblastos e células do músculo liso. Seu efeito é mediado pelo receptor TNF-R1, universalmente expresso em todos os tipos de célula, e o TNF-R2, expresso em células imunológicas e endoteliais. Essa citocina regula a sobrevivência celular (apoptose e necrose), ativa o endotélio vascular, promove o recrutamento de células imunes, hiperalgisia e dano tecidual.	(KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016; MEHTA, A. K.; GRACIAS; CROFT, 2018)
IFN tipo I	A família IFN I inclui IFN- α , β , ϵ , κ , e ω . Essas citocinas são secretadas a partir de diferentes tipos de células infectadas. Ativam a resposta imune inata, promovendo a produção de citocinas e ativação de células NK. A sinalização desencadeada por essas citocinas leva a expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) que codifica proteínas importantes para restrição da replicação de patógenos. IFNs I são contexto-específico, dependendo do tecido, estímulo microbiano, tipo de receptor para o reconhecimento do ácido nucleico do patógeno e do subtipo de IFN envolvido.	(CROW; RONNBLOM, 2019; MAKRIS; PAULSEN; JOHANSSON, 2017)
IFN tipo III	Esta classe de IFN corresponde especificamente ao IFN- γ . Desempenha um papel importante na imunidade celular, sendo responsável por funções protetoras contra infecções e exercer um papel crítico na imunidade antitumoral. Secretado majoritariamente por linfócitos ativados, incluindo CD4, CD8, NK e gamma delta, também por células B e células apresentadoras de antígenos. Sua sinalização depende dos receptores IFN γ R1/R2 distribuído em células hematopoiéticas e outras linhagens celulares. IL-12 é um potente indutor de IFN- γ .	(IVASHKIV, 2018; KOPITAR-JERALA, 2017)
IFN tipo III	Compreende os IFN λ 1-4. Se assemelha parcialmente aos IFN I visto que (1) são induzidos por vias de reconhecimento de patógeno semelhante, (2) desencadeiam uma resposta antiviral e imunomoduladora e (3) ativa o complexo ISGF3. Protege principalmente as superfícies e mucosas do corpo. As subunidades IFNLR1 and IL-10R β do seu receptor reconhece diferentes tipos de IFN.	(LAZEAR; SCHOGGINS; DIAMOND, 2019; MESEV; LEDESMA; PLOSS, 2019)

Fonte: Autora (2021)

Em seguida, outra resposta efetora contra o vírus envolve a estimulação de células T CD8⁺ por meio das células Th1, com o objetivo de eliminar as células infectadas pelo coronavírus. Simultaneamente, células T CD4⁺ podem induzir a resposta imune humoral, através do estímulo às células B para produzir anticorpos específicos contra o antígeno (RABI *et al.*, 2020).

Uma questão significativa referente aos pacientes COVID-19 é a linfopenia acentuada e ativação excessiva das células T remanescentes, e apesar das evidências que explicam o fenômeno de uma forma geral, os pormenores do mecanismo ainda não estão elucidados (WANG, F. *et al.*, 2020; XU, Z. *et al.*, 2020). No que diz respeito as células de memória, pacientes infectados pelo SARS-CoV haviam demonstrado a presença de células T CD4⁺ e CD8⁺ capazes de se proliferar e produzir IFN γ mesmo quatro anos após a recuperação da doença (FAN, Y. Y. *et al.*,

2009). Outro estudo aponta células T de memória presentes em 60% dos indivíduos analisados seis anos depois da infecção (TANG, F. *et al.*, 2011).

2.4 RESPOSTA DE INTERFERONS

O pulmão é um órgão bastante susceptível ao ataque de patógenos, visto que no processo respiratório é natural a inspiração facilita a internalização de micro-organismos e partículas que podem desencadear uma resposta imunológica. Nesse contexto, os IFNs desempenham seu papel de manter o funcionamento adequado do órgão através da erradicação de patógenos e da regulação da inflamação (MAJOR *et al.*, 2020).

Há três classes de IFNs, com especificidades em cada uma delas. Os IFN tipo I compreendem INF- α , β , ϵ , κ e ω . Esses subtipos possuem afinidades diferentes por seu receptor, variando a intensidade da sinalização. Todos os IFN-I dependem do receptor heterodimérico composto pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2 para ativar o complexo ISGF3, responsável pela ligação aos elementos de resposta estimulados por IFN (ISREs) no núcleo e inicia a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs). Em relação à funcionalidade, o INF I são a principal linha de defesa contra os vírus (ARIMOTO *et al.*, 2018; TEIJARO, 2016).

IFN do tipo II refere-se ao IFN- γ , que se liga ao complexo IFNGR e após uma cascata de eventos, A produção de INF- γ é restrita a células hematopoiéticas, enquanto IFNGR é amplamente expresso em diversos tipos celulares. No geral, essa citocina é importante para a regulação do sistema imunológico, ativação de células mieloides e conecta a resposta imune inata e adaptativa (IVASHKIV, 2018; SPALLUTO *et al.*, 2017).

Por outro lado, IFN tipo III inclui os IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 e IFN λ 4. Estes se ligam ao receptor heterodimérico composto de uma subunidade INFLR1 e IL-10R2. Esses IFNs agem majoritariamente nas mucosas e barreira hematoencefálica. Foi previamente demonstrado que essa classe de citocina sustenta a sinalização de IFN-I e que ativação dos seus receptores pode induzir a expressão dos mesmos ISGs que o IFN-I via ISGF3 (HAMMING *et al.*, 2013; TEIJARO, 2016).

Em resumo, sinalização de todos os tipos de interferon se dá através da via JAK/STAT onde a interação com os receptores induz a uma sequência de ativação de quinases (JAK e TYK) e STATS, resultando na transcrição de ISGs. Em situações de

ausência de estímulo, JAK inativada fica ligada ao domínio citoplasmático do receptor de IFN e uma vez que ocorre a ativação mediante ligação do IFN, essas JAKs serão fosforiladas, com fosforilação subsequente do receptor de IFN e reposicionamento da proteína STAT. Em seguida, essas STATs também são fosforiladas e liberadas do receptor. Após a associação com o IRF9, o heterodímero STAT1-2 ativa a transcrição do complexo ISGF3, enquanto os homodímeros STATs são ativadores transcricionais direto. Usualmente, os tipos I e III de IFN ativam a sinalização via TYK2 e JAK1, resultando na STAT1-2 heterodimerização e formação de ISGF3 (SCHINDLER; LEVY, D. E.; DECKER, 2007; WANG, Wenshi *et al.*, 2017).

Considerando o objetivo deste trabalho, é importante discutir o IFN-I, cuja indução ocorre em decorrência da ativação de diferentes receptores. Durante a infecção por CoVs, os PRRs o reconhecem e ativam IRF3/IRF7 para a produção de IFN-I e outras citocinas, com a finalidade de orquestrar uma resposta efetiva na contenção do vírus (HUANG, K. J. *et al.*, 2005; LEE, J. S.; SHIN, E.-C., 2020).

Contudo, para burlar a defesa do hospedeiro mediada por IFNs, diversas famílias de vírus desenvolveram mecanismos de antagonizar seu reconhecimento por PRRs, alterar a via de produção de IFN e a função de ISGs. Para tal, o SARS-CoV e SARS-CoV-2 utilizam de suas proteínas supracitadas (HADJADJ *et al.*, 2020).

A concentração do INF ao longo do curso da COVID-19 é um ponto controverso. Dezenas de estudos relatam uma baixa resposta de interferons no paciente durante a doença, especialmente nos estágios iniciais, e que essa ausência de IFN seria então um fator de risco para o desenvolvimento de quadros mais graves (HU, Z. J. *et al.*, 2020). Essa falta de IFN é refletida na diminuição da capacidade do hospedeiro de restringir o espalhamento do vírus. Mais especificamente, essa diminuição pode ser associada com a persistência da carga viral e inflamação desregulada (HADJADJ *et al.*, 2020).

Outros trabalhos fazem contrapontos a esses resultados, demonstrando o aumento da concentração de IFN com o passar do tempo, e uma provável correlação com a melhora dos pacientes (CONTOLI *et al.*, 2021). A investigação da expressão gênica para o entendimento do perfil de IFN de diferentes pacientes foi realizada através de diferentes coortes. É possível perceber uma associação entre a carga viral, níveis de IFN- α e severidade, bem como uma assinatura expressiva de IFN-I, que configura em um risco de vida para os pacientes COVID-19 (WEI, L. *et al.*, 2020). Por último, uma meta-análise conduzida com artigos que avaliaram os níveis de INF I em

diferentes estágios da COVID-19 demonstrou que não há diferença estatística quando indivíduos com quadro leve, severo ou crítico são confrontados (SILVA, R. P. DA *et al.*, 2021).

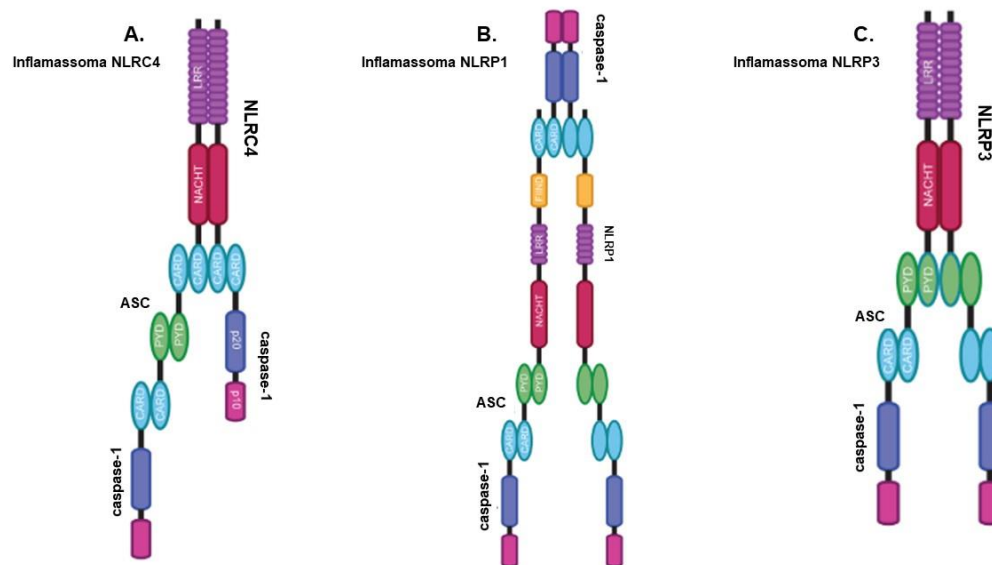
Estas diferenças podem ser explicadas por conta da fragilidade na definição da severidade, divergências na metodologia e modificações no intervalo de tempo de coleta da amostra.

2.5 INFLAMASSOMA

O papel central da inflamação no agravamento dos casos da COVID-19 tem sido extensivamente documentado através de diferentes perspectivas, e o envolvimento do inflamassoma tem sido cautelosamente apresentado (LARA; MACÍAS-VERDE; BURGOS-BURGOS, 2020; SHAH, A., 2020). Evidências robustas demonstram uma associação entre a super ativação do complexo do inflamassoma e severidade dos sintomas clínicos. Pacientes em estado crítico apresentam níveis elevados de IL-1 β e IL-18, relacionados com o inflamassoma (RODRIGUES, T. S. *et al.*, 2020; TOLDO *et al.*, 2021).

Estruturalmente, o complexo do inflamassoma é um arcabouço de proteínas formado por: uma porção central composta por um NLR que possui um domínio pirina em sua porção N-terminal (NLRP); um domínio rico em leucinas (LRRs) na porção C-terminal; e o domínio NATCH de interação proteína-proteína (**Figura 4**). Após o reconhecimento de PAMPs, toda essa estrutura será oligomerizada a partir do domínio NATCH, resultando no recrutamento da proteína ASC, que por sua vez irá acoplar a pro-caspase-1 e permitir sua ativação. Uma vez ativada, a caspase-1 promove a clivagem proteolítica da pro-IL-1 β e pro-IL-18 em sua forma maturada, além de estimular a sua secreção (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; PINKERTON *et al.*, 2017).

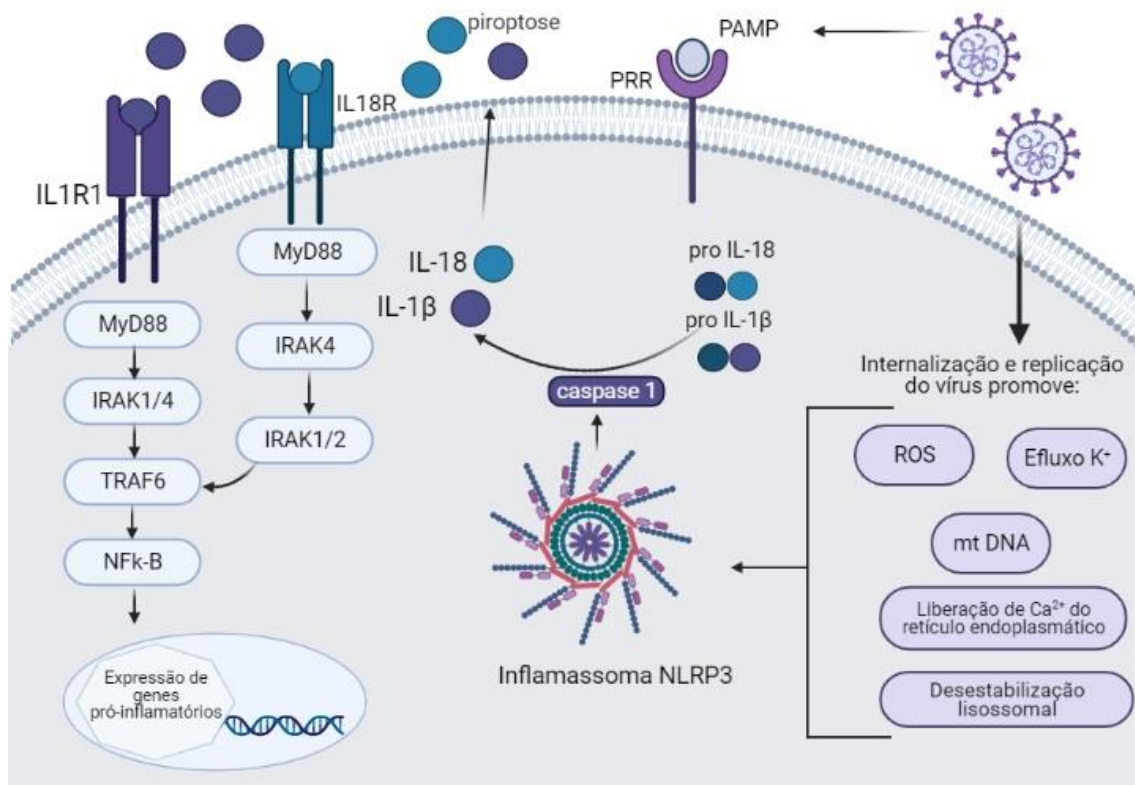
Figura 4 – Representação comparativa das estruturas de inflamassomas canônicos



Fonte: Adaptada (PLATNICH; MURUVE, 2019)

A montagem desse complexo é rigorosamente regulada, visto que o inflamassoma envolve múltiplas moléculas e é fundamental em diversos processos biológicos. O primeiro sinal para a sua ativação é a detecção de um estímulo exógeno através dos TLRs, levando a transcrição de NF- κ B e consequente aumento de expressão de NLRP3, pro-caspase-1, pro-IL-18 e pro-IL-1 β . Em células não ativadas, todas essas moléculas não são expressas em níveis adequados para a resposta inflamatória. O segundo sinal envolve a detecção de estímulos endógenos (DAMPs) como modificações do fluxo iônico, aumento de ROS e dano lisossomal, onde cada um desses eventos possui particularidades. No que se refere ao desbalanço iônico, efluxo de K^+ , mobilização do Ca^{2+} e influxo de Na^+ implicam na ativação do NLRP3 (JO *et al.*, 2016; PLATNICH; MURUVE, 2019) (**Figura 5**).

Figura 5 – Ativação do inflamassoma após o reconhecimento de PAMPs e DAMPs



Fonte: Autora (2021)

A proteína E, ORF3a e ORF8b, do SARS-CoV ativa o NLRP3 (o inflamassoma mais expresso em tecido pulmonar) devido ao desbalanço iônico. De forma sucinta, a viroporina resultante da proteína E forma um canal iônico que facilita o extravasamento do Ca^{2+} no citosol (NIETO-TORRES *et al.*, 2015). Por sua vez, ORF3a promove a ubiquitinação da ASC mediada por fator-3 associado ao receptor de TNF (TRAF3) e subsequente ativação inflamassoma, além de induzir a expressão gênica da pro-IL-1β e secreção de IL-1β (SIU *et al.*, 2019). Por último, a ORF8b ativa o inflamassoma NLRP3 através da interação direta com LRR, funcionando como canal iônico (SHI, C. S. *et al.*, 2019).

A ativação excessiva do inflamassoma e posterior liberação de IL-1β e IL-18 pode desencadear cascatas imunológicas como a secreção de demais citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, migração celular e dano pulmonar (GRAILER *et al.*, 2014; YAP; MORIYAMA; IWASAKI, 2020). Na COVID-19, há uma relação complexa entre estes componentes que precisa ser melhor caracterizada, e as evidências disponíveis até o momento apontam para uma influência do inflamassoma sobre os sintomas severos reportados pelos pacientes. Portanto, entender como fatores genéticos atuam

nesta rede de interação pode ajudar a entender as discrepâncias entre os indivíduos afetados.

2.5.1 Inflamassoma e sua interferência nos sintomas da COVID-19

A SDRA a forma mais severa da lesão pulmonar aguda, é uma síndrome respiratória dramática sem tratamentos específicos. Devido à ausência de biomarcadores exclusivos, o diagnóstico é baseado em uma combinação de manifestações clínicas (FAN, E.; BRODIE; SLUTSKY, 2018), como o tempo do surgimento dos sintomas, mudanças na radiografia do pulmão e existência de opacidade bilateral, severidade da relação PaO_2/FiO_2 e presença de edema (RANIERI *et al.*, 2012). Adicionalmente, observa-se um aumento considerável na permeabilidade vascular, aumento de peso do pulmão e perda de tecido aerado, que resulta em hipóxia severa e choque séptico (GIBELIN *et al.*, 2016; KIM, W. Y.; HONG, S. B., 2016).

Apesar do novo coronavírus, a SDRA é, por si só, um problema extremamente complexo (REISS; SCHUPPERT; UHLIG, 2018). Conhecida por ser uma síndrome de UTI com uma alta taxa de mortalidade e diagnóstico dificultoso, essa síndrome se torna cada vez mais severa devido as proporções globais do SARS-CoV-2. De fato, entre os indivíduos sintomáticos, estima-se que 15% desenvolva o quadro crítico e se torne susceptível ao desenvolvimento da SDRA (WU, Chaomin *et al.*, 2020; YANG, X. *et al.*, 2020).

Após a entrada do vírus em células permissivas, a resposta imune inata é rápida e agressivamente desencadeada para tentar eliminar o patógeno. Entretanto, em resposta à infecção, ocorre a exacerbação da inflamação, que se torna responsável por danos teciduais mais expressivos que a própria replicação viral. A severidade da COVID-19 aparenta estar diretamente ligada a essa desregulação inflamatória e liberação massiva de citocinas. Em alguns casos, isso pode levar a um estado denominado hipercitocinemia, também referido como tempestade de citocinas, capaz de desencadear a SDRA e levar à falência múltipla de órgãos (GIRIJA; SHANKAR; LARSSON, 2020; MERAD; MARTIN, J. C., 2020).

Dentre as características da SDRA, o mais significativo é a resposta inflamatória exacerbada e desregulada. Simultaneamente, diversos eventos ocorrem para promover um feedback positivo de vias da inflamação e, consequentemente, há

um aumento de mediadores pró-inflamatórios - como citocinas e quimiocinas - determinantes para o aumento da severidade da doença e mortalidade (DOLINAY *et al.*, 2012; ROGERS, A. J. *et al.*, 2019).

Estudos recentes sobre a fisiopatologia da SDRA correlaciona o inflamassoma como um dos principais fatores responsáveis pela intensa inflamação que causa a injúria tecidual nos pacientes acometidos (BORTOLOTTI; FAURE; KIPNIS, 2018; CHEN, J. *et al.*, 2018; WANG, Shuang *et al.*, 2015) (**Figura 6**). O inflamassoma também tem sido relacionado com outras doenças pulmonares, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), um problema gradual causado pela exposição das vias aéreas a agentes nocivos, como fumaça proveniente do cigarro, capaz de ativar o NLRP3, resultando em inflamação, produção de muco e dispneia. No escarro de pacientes sofrendo desta condição, os níveis de IL-1 β se apresentam significativamente elevados (CHUNG, 2001). Um modelo murino para DPOC utilizando animal *knockout* para o NLRP3 observou que a ausência desse gene preveniu o desenvolvimento da doença nos animais expostos a fumaça de cigarro durante um período longo de tempo (YANG, W. *et al.*, 2015).

O inflamassoma é também considerado como um importante mediador da fibrose pulmonar, caracterizada por uma de inflamação crônica e cicatrizes que comprometem o processo de respiração. Apesar de não haver uma causa única formalmente estabelecida para essa doença, diversos agentes indutores de fibrose são capazes de ativar o inflamassoma (GASSE *et al.*, 2007). Além disso, a secreção de IL-1 β induz a produção de TGF- β , uma citocina pró-fibrótica que promove quimioatração de neutrófilos e contribui para o dano epitelial (WILSON *et al.*, 2010). Curiosamente, os níveis de TGF- β estavam aumentados em pacientes SARS e MERS, e a fibrose também está relacionada com a COVID-19 (LECHOWICZ *et al.*, 2020). Apesar do envolvimento da IL-1 β na SDRA estar descrito há mais de duas décadas, descrever as funções chave do complexo do inflamassoma nesse processo permite o delineamento assertivo de novas estratégias de tratamento.

A partir do momento da infecção viral, diversos eventos ocorrem em sinergia levando à irregularidades sistêmicas e perpetuando o desbalanço inflamatório (NIETO-TORRES *et al.*, 2014; TRIANTAFILOU, K.; TRIANTAFILOU, M., 2014). Em paralelo, macrófagos alveolares secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β mantendo a cascata da inflamação que resulta na liberação de mais PAMPs e DAMPs capazes de ativar o complexo do inflamassoma. Adicionalmente, a presença

da SDRA pode resultar na liberação de DAMPs mitocondriais que resultam no aumento da permeabilidade vascular e ativação de células polimorfonucleares, disseminando inflamação e permitindo o aumento da mortalidade dos pacientes (BLANCO-MELO *et al.*, 2020; CHANNAPPANAVAR *et al.*, 2016; THACHIL *et al.*, 2020).

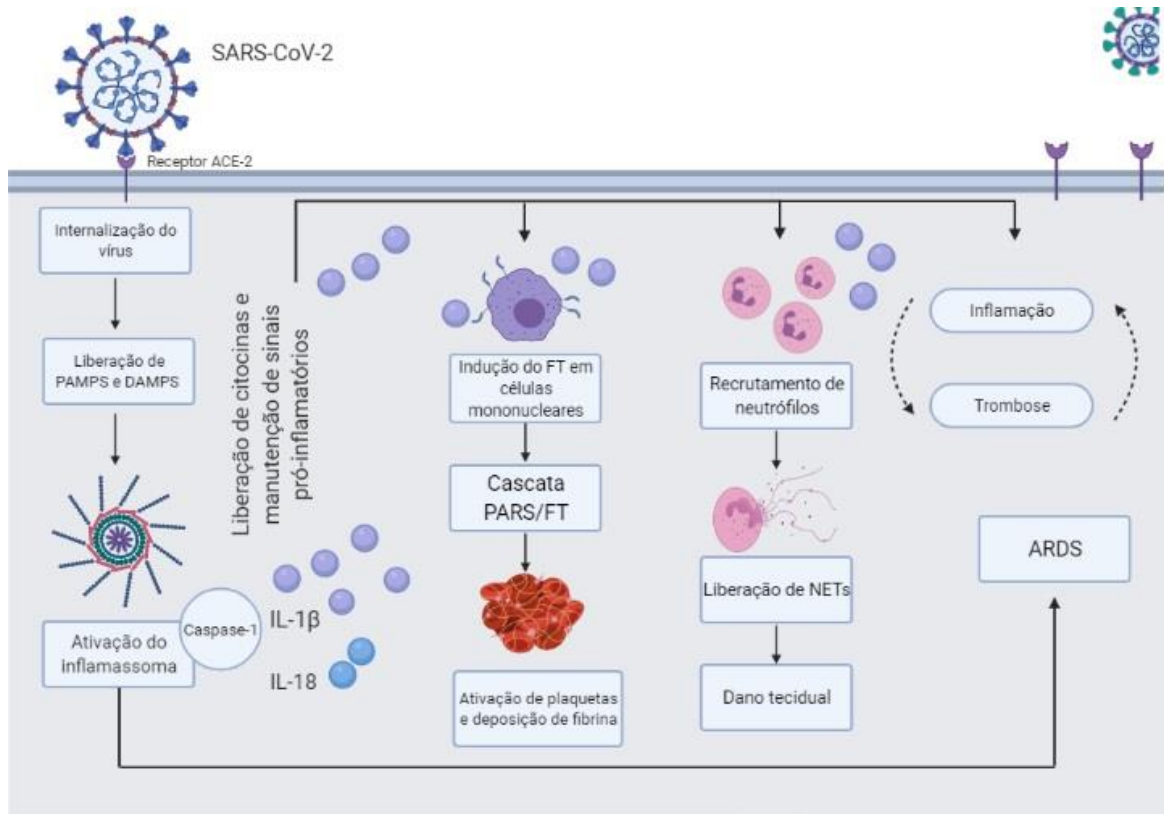
Quando analisado o sangue periférico de indivíduos diagnosticados com SDRA, foi observado o aumento significativo dos níveis de mRNA de CASP-1, IL-1 β e IL-18, bem como o aumento de IL-18 no plasma. Além disso, a severidade e mortalidade foi maior em entre o grupo com maior índice de IL-18, que se relaciona com os níveis de lactato, um biomarcador amplamente utilizado no prognóstico de pacientes críticos (ROGERS, A. J. *et al.*, 2019).

Em modelo murino de SDRA induzida por ventilação mecânica, os níveis de IL-18 estão aumentados no pulmão, soro e lavado broncoalveolar. Em animais *knock-out* para CASP-1 ou IL-18, há menos injúrias em resposta ao estresse induzido por ventilação mecânica. Estes achados demonstram a participação de moléculas atreladas ao inflamassoma no desenvolvimento e severidade da SDRA (ROGERS, A. J. *et al.*, 2019).

Outro fator atrelado à SDRA e ao quadro crítico da COVID-19 é o neutrófilo e as armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) (MIDDLETON *et al.*, 2020). Apesar da sua importante função na eliminação de patógenos, as NETs tem sido fortemente indicadas como um fator agravante em LPA, SDRA, coagulopatias e falência múltipla de órgãos, além de ativar o inflamassoma. Pacientes com a COVID-19 severa apresentaram aumento de neutrófilos no sangue, com a presença marcante de NETs e subsequente dano tecidual (CHEN, K. W.; DEMARCO; BROZ, 2020) (Figura 6).

Também foi reportado que a liberação de NETs por neutrófilos ativados em indivíduos positivo para o SARS-CoV-2 promoveu a morte de células epiteliais. Ademais, a análise post mortem do pulmão de pacientes indicou a presença de NETs neste tecido, justificando a necessidade de investigar as relações e consequências da liberação destas armadilhas extracelulares (SCHÖNRICH; RAFTERY; SAMSTAG, 2020).

Figura 6 – O quadro clínico dos pacientes COVID-19 é influenciado por diversos eventos.



Fonte: Autora (2021)

Na prática clínica, complicações relacionadas a anormalidades na coagulação são extensivamente observadas em pacientes com a COVID-19. A determinação de marcadores de coagulação como dímero-D, fibrina, fibrinogênio, protrombina e plaquetas se tornou rotineiro e fundamental para a determinação de coagulopatias. Nesses pacientes, as anormalidades mais comuns são a trombocitopenia leve, aumento de dímero-D, aumento do tempo de protrombina (TP) e coagulação intravascular disseminada (CDI) (KLOK *et al.*, 2020).

De acordo com as evidências disponíveis até então, desbalanços na coagulação é uma das variáveis mais relevantes na determinação da severidade da COVID-19. Apesar de eventos decorrentes da infecção por SARS-CoV-2 (como a hipóxia) predispor o paciente a complicações trombóticas, pesquisadores hipotetizam que o tromboembolismo pulmonar e outras alterações na coagulação não são diretamente provocadas pela entrada do vírus, e sim pela intensa resposta inflamatória (CONNORS; LEVY, J. H., 2020; LIPPI; PLEBANI; HENRY, 2020).

O ponto de interação/correlação entre inflamação e coagulação é a ativação dos receptores ativados por protease (PARs) pelo fator tecidual (FT) e, ao final de uma longa via de sinalização, ocorre a ativação de plaquetas e depósito de fibrina

(TIAN, S. *et al.*, 2020). Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF podem induzir a expressão de FT em células mononucleares, criando um feedback de ativação da coagulação (Figura 6). Em biópsia pós morte do pulmão de pacientes críticos, foi observado elevada agregação plaquetária, formação de coágulos e depósito de fibrina, confirmando a relevância desta manifestação (CARSANA *et al.*, 2020; DENIS *et al.*, 2005; MENTER *et al.*, 2020; RAPKIEWICZ *et al.*, 2020).

Plaquetas são uma ligação entre a resposta imune e a coagulação e desempenham uma função primordial na manutenção da homeostasia, entretanto, apresentam a função atípica de maturar pro-IL-1 β a partir de seu pre-mRNA (HOTTZ *et al.*, 2013). Portanto, esta é mais uma via possível para a síntese dessa citocina efetora para diferentes processos biológicos. Adicionalmente, plaquetas também expressam NLRP3 e ASC, sendo capazes de desencadear a montagem do inflamassoma e produzir IL-1 β (WU, Congqing *et al.*, 2019).

Nas investigações para determinar a associação entre a ativação do inflamassoma e coagulação do sangue, foi encontrado que o NLRP3 é capaz de desencadear a inflamação sistêmica, trombose e levar à morte. De forma sucinta, a piroptose promovida pela ativação do inflamassoma induz macrófagos piroptóticos a liberar FT. Consequentemente, essa proteína foi capaz de promover uma coagulação disseminada e desordens sistêmicas (CHANCHAL *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2017). Dado o aumento contínuo de evidências descrevendo o papel abrangente do inflamassoma, é indispensável desenvolver estudos robustos que expliquem pontos desconhecidos/obscuros na influência deste complexo proteico com outros processos patológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO DOS DATASETS

Através do GEO dataset, um banco de dados com curadoria do NCBI e especializado em datasets de expressão gênica com curadoria, nós obtivemos as amostras analisadas no presente estudo. Visando a inclusão de estudos capazes de gerar resultados clinicamente confiáveis, optou-se pela não inclusão de amostras com as seguintes características: experimentos em modelo *in vitro*, amostras não pertencentes a *Homo sapiens*, estudos conduzidos com pacientes negativos para a COVID-19, dados não disponibilizados publicamente, amostras não sequenciadas em plataforma Illumina ou utilizando método diferente de bulk RNA-seq, (como o miRNA-seq ou single cell RNA-seq). A pesquisa por datasets foi realizada em 07/01/2021 e o pipeline pode ser observado na figura 7.

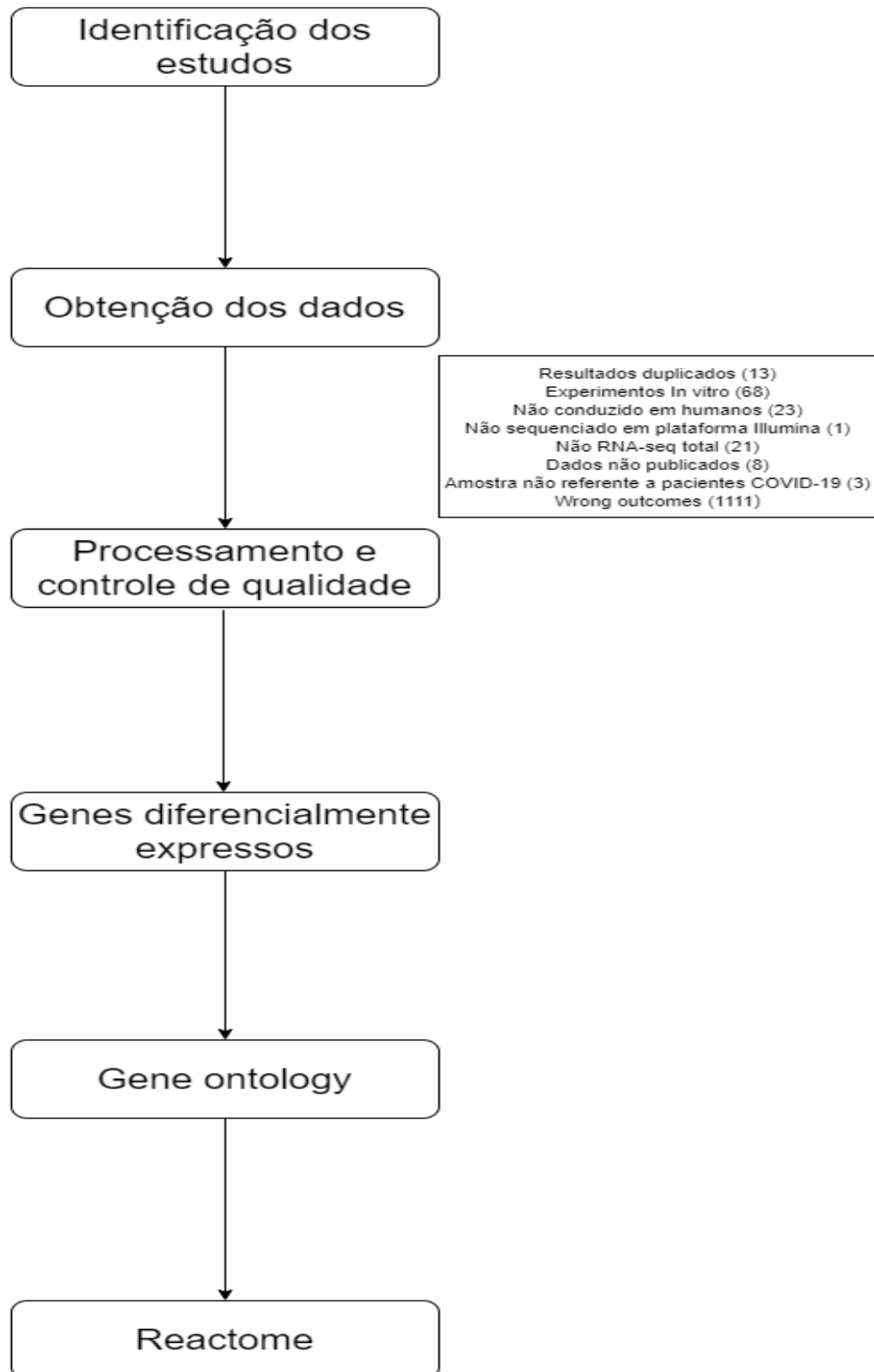
3.2 CONTROLE DE QUALIDADE

Para averiguar a qualidade dos arquivos fastq.gz e identificar possíveis falhas durante o sequenciamento, utilizou-se o FastQC. Esse software tem como objetivo identificar erros tanto no sequenciamento como no material de preparação da library, aumentando a confiabilidade das análises posteriores e reduzindo vieses.

Baseado em modelos estatísticos e em algoritmos específicos, é possível adquirir relatórios sobre as principais características das *reads*, com as avaliações “inteiramente normal”, “levemente anormal” ou “anormal”. Os pontos avaliados são: qualidade da sequência por base, score de qualidade por sequência, conteúdo da sequência por base, conteúdo GC por base, conteúdo N por base, distribuição do comprimento da sequência, nível de sequências duplicadas, sequências super representativas e conteúdo kmer.

Após fazer a análise da qualidade das *reads* e verificação da existência de adaptadores, a etapa subsequente envolve uma “limpeza” destes arquivos, de modo que as *reads* remanescentes estarão aptas ao processo de alinhamento.

Figura 7 – Pipeline da aquisição, processamento e análises dos dados de RNA-seq



Fonte: Autora (2021)

3.3 TRIMAGEM

O processo seguinte para a análise dos dados envolve a correção e/ou remoção de sequências incorretas ou que possam conter vetores, rRNAs e cauda poli-A. Nesse caso, o usuário pode optar por removê-las por completo, caso não satisfaçam um determinado critério de qualidade, ou mesmo descartar as porções de baixa qualidade. O último caso é denominado “trimagem”, que também pode ser realizada a partir da remoção de um tamanho fixo de uma ou ambas as extremidades da *read*. Para este processo, foi utilizado o software Trimmomatic.

Outro aspecto relevante está relacionado à remoção de sequências de adaptadores, cuja permanência pode afetar consideravelmente as análises subsequentes. Utilizando os parâmetros padrão do Trimmomatic, foi feita a remoção dos adaptadores, remoção de reads curtos e de baixa qualidade.

3.4 INDEXAÇÃO DO GENOMA DE REFERÊNCIA

Para determinar a origem/posição das nossas reads em relação genoma humano, foi utilizado o software STAR aligner. Seu algoritmo envolve dois passos para o alinhamento de sequências não-contínuas diretamente ao genoma de referência (neste caso, o Hg38). O primeiro, denominado *seed searching*, consiste na busca por *Maximal Mappable Prefix* (MMP), que pode ser definida como a sequência mais longa que combina exatamente com uma ou mais regiões do genoma de referência. A segunda fase consiste em *Clustering, stitching, and scoring*, onde, baseado no melhor alinhamento das *reads*, as *seeds* individuais serão “unidas”. Através dessa abordagem é possível garantir a acurácia do processo e o alinhamento adequado das reads.

Neste trabalho foram aplicados os parâmetros padrão do software para alinhamentos pair-ended. O arquivo resultante, em formato BAM (Binary Sequence Alignment/Map), gerado a partir das sequências aceitas pelo alinhador foi utilizado na etapa posterior de contagem das *reads*.

3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Para entender os mecanismos genéticos que influenciam em um determinado fenótipo é necessário determinar se a diferença entre a média nos níveis de expressão gênica de diferentes grupos é estatisticamente significativa. Sendo assim, foi utilizado o pacote DeSeq2, em linguagem R, que permite analisar os dados de RNA-seq de uma forma mais quantitativa e acurada em comparação a outros softwares.

Em linhas gerais, a abordagem do método se baseia no modelo de distribuição Binominal Negativa, e assim o DeSeq2 é capaz de fazer a quantificação e inferência estatística das modificações entre as duas condições estudadas. Nesse programa, é possível fazer dois testes de hipótese: o da razão de verossimilhança (*Likelihood ratio test*) e o Teste de Wald.

A partir do arquivo, em formato BAM, gerado com as *reads* corretamente mapeadas, este pacote calcula o nível de expressão e realiza os testes estatísticos para definir o que efetivamente está diferencialmente expresso. O critério de definição do DEG como *upregulated* ou *downregulated* considerou o $\log_2\text{foldchange} > 1$ ou < -1 , respectivamente. Foi definida como significância estatística o valor de p ajustado < 0.05 (ajustado pela correção por *false Discovery rate* [FDR]).

3.6 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO DOS TERMOS

A fim de unificar a representação dos genes diferencialmente expressos, utilizamos o Gene Ontology (GO), uma ferramenta da bioinformática capaz de clusterizar os genes de acordo com seu papel biológico. Para tal, a listagem dos DEGs foi submetida ao dataset referente a processo biológico e parâmetros padrão de análise estatística (Teste Exato de Fischer e FDR) para gerar os resultados.

3.7 REACTOMA

Para categorizar as vias de sinalização referente aos nossos DEGs, utilizamos o reactome. Organizar as informações sobre as vias biológicas de um determinado experimento. Utilizando a opção ferramenta de análise, seguido da especificação para

Homo sapiens, aplicou-se os parâmetros padrão da ferramenta para aquisição dos resultados.

3.8 META-ANÁLISE

Para integrar e validar os achados dos estudos individuais, foi conduzida uma meta-análise utilizando os datasets com metodologia similar, considerando o tipo de amostra analisada. Foi utilizado os arquivos de contagem bruta dos genes para resultar na identificação de novos DEGs, utilizando no pacote RankProd para ranquear os resultados de acordo com o $\log_2$ fold change ($\log_2$ FC) através de uma abordagem não-paramétrica. Consequentemente, é possível identificar os DEGs entre as amostras de experimentos independentes.

Após a identificação dos DEGs, foi conduzida a análise de enriquecimento dos termos utilizando o pacote GOExpress, disponível para o R software. Através do pacote ReactomePA, foi conduzida a análise para identificar as vias associadas com os DEGs adquiridos na meta-análise. Foi considerado como significativo o valor de $p < 0.05$ após a correção pela FDR.

4 RESULTADOS

4.1 INCLUSÃO DOS DATASETS

A busca pelo termo SARS-CoV-2 no GEO dataset retornou 1.302 resultados. Após aplicar os critérios de inclusão e exclusão, três estudos permaneceram para análise, e seus aspectos mais relevantes estão sumarizados na tabela 3.

Primeiro, o trabalho de Desai e colaboradores (DESAI, N. *et al.*, 2020) (Estudo 1, GSE150316) buscou investigar a heterogeneidade do curso clínico da COVID-19. Através da análise de tecido post-mortem, pacientes COVID-19 com sintomas leves ou severos foram comparados ao grupo controle (negativo para SARS-CoV-2). Os autores reportaram a presença de 338 DEGs no grupo no grupo severo e 5.710 DEGs referente aos casos leves. Alta expressão de ISGs (IRF1, IFI44L e IFIT3) e genes antivirais (ADAR, OAS3) foi observada.

Além disso, Overmyer e colaboradores (OVERMYER *et al.*, 2021) (Estudo 2, GSE157103) utilizaram amostras de sangue periférico de pacientes com complicações respiratórias que testaram positivo (n=102) e negativo (n=26) para COVID-19. Os autores descreveram a presença de 470 genes altamente expressos em pacientes severos, incluindo genes reguladores de kinases, reguladores de funções moleculares e genes da via NF- κ B. Adicionalmente, os autores apresentaram uma variedade de biomoléculas associadas com a severidade da doença.

Por último, Gill e colaboradores (GILL *et al.*, 2020) (Estudo 3, GSE154998) demonstraram a singularidade dos transcritos dos leucócitos de pacientes severos (n=7) após um dia de admissão na UTI, em comparação a indivíduos também mantidos na UTI, mas negativos para o SARS-CoV-2 (n=7). Os autores constataram a presença de 1.311 DEGs, sendo 254 upregulated e 1.057 downregulated. Genes das vias de interferon, sinalização do sistema complemento, apoptose e coagulação foram apontados como superexpressos.

Tabela 3 – Descrição dos estudos selecionados a partir dos critérios de inclusão

Identificação	Autor	Acesso GSE	Nº de pacientes	Índice de severidade	Tipo de amostra	Alinhamento	Genoma de referência	Análise DEG	FDR	Objetivo do estudo	Principais resultados
Estudo 1	Desai <i>et al.</i>	GSE150316	COVID-19 negativo (n=5) COVID-19 leve (n= 12) COVID-19 severa (n=11)	Baseado em RNA in situ hybridization, os casos foram definidos como alta carga viral (área do pulmão infectada > 2%) ou baixa carga viral	Amostras de autópsia do pulmão, tecido cardíaco e tecido renal	STAR aligner	HG38	DeSeq2	<0.01	Caracterizar a heterogeneidade do SARS-CoV-2 em diferentes órgãos de pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19.	338 e 5710 genes upregulated em pacientes severo e leve, respectivamente. O trabalho destaca a disparidade da resposta imunológica entre os pacientes e demonstra a presença de genes da via interferônica em casos severos. A relação entre a carga viral e diferentes respostas do hospedeiro foi apresentada.
Estudo 2	Overmyer <i>et al.</i>	GSE157103	COVID-19 negativo (n=26) COVID-19 positivo (n=102)	Pacientes não-UTI: Índice de comorbidade de Charlson Pacientes em UTI: Índice de comorbidade Charlson, APACHEII, SOFA, SAPSII	Sangue periférico	Bowtie 2	HG38	GSEA	<0.01	Reconhecer diferentes classes de moléculas que podem ser utilizadas como preditor de prognóstico para os pacientes.	Este estudo multi-ômicas apresentou 146 proteínas plasmáticas, 168 lipídeos plasmáticos, 13 metabólitos plasmáticos e 2537 transcritos de leucócitos significativamente associados com o status da COVID-19. Os autores também apresentaram degranulação de neutrófilo, desregulação plaquetária e danos nos vasos como processos biológicos relevantes alterados em pacientes positivo.
Estudo 3	Gill <i>et al.</i>	GSE154998	COVID-19 negativo (n=7) COVID-19 positivo(n=7)	SOFA score	Sangue periférico	STAR aligner	hg19	Partek Flow/ GSEA	<0.1	Descrever o perfil transcricional de pacientes COVID-19 um dia após a admissão em UTI para entender a dinâmica da resposta do hospedeiro.	Após comparar os pacientes COVID-19 com o grupo controle, foi encontrado 254 upregulated e 1057 genes downregulated. Os autores relatam o aumento da expressão de genes estimulados por interferon (ISGs), genes envolvidos na via do TNF e sinalização da IL-1, sistema complemento, apoptose e coagulação. Em contrapartida, genes envolvidos na síntese proteica, fosforilação oxidativa e reparo do DNA estão downregulated.

4.2 REVISÃO SISTEMÁTICA

Para a identificação e comparação das alterações moleculares no hospedeiro em resposta ao SARS-CoV-2, foi feita a análise de DEGs para cada um dos datasets, usando o mesmo protocolo.

Primeiro, foi analisado o estudo 1 com o objetivo de avaliar as alterações na expressão gênica entre diferentes tecidos e utilizando grupos distintos de pacientes. Amostras de autópsia do pulmão de pacientes leves e severo foram comparadas com o grupo controle, enquanto os tecidos cardíaco e renal foram confrontadas entre os grupos leve e severo. Ao comparar o tecido pulmonar do grupo COVID-19, independente do grau da doença, com o grupo controle, foi identificado 15 DEGs, todos upregulated. Os genes apresentam atividades diversas, incluindo função similar ao fibrinogênio (FGL1), indução da diferenciação neuronal (NEUROD2) e participação no metabolismo de drogas (SULT2A1). Resultados similares foram obtidos após a comparação do pulmão entre pacientes com sintomas leves e o grupo controle, e pacientes com o quadro severo e o grupo controle. Em ambos os casos, identificamos 14 DEGs upregulated, relativos à enzima hepática (BAAT), proteínas associadas a tumores (MAGEA2 e MAGEA2B), proteína homóloga ao fibrinogênio (FGL1) e uma glicoproteína plasmática multifuncional (AMBP) que exerce função regulatória no sistema imunológico. Não foi identificado DEGs após a comparação entre casos leves e casos severos.

Em relação ao tecido cardíaco, foram encontrados 20 DEGs de pacientes com sintomas leves e severos, em comparação ao grupo controle. Dentre os 16 genes upregulated, nós detectamos a expressão de FGF23 (fator de crescimento de fibroblasto, um importante mitógeno e fundamental para a sobrevivência celular) e ORM1 (responsável por codificar uma proteína plasmática presente na inflamação aguda). Por outro lado, os genes downregulated foram AICDA (que codifica a enzima Citidina Desaminase Ativada por Indução, importante para a troca de classe das imunoglobulinas) e FOXD4L1 (fator de transcrição). Considerando o tecido renal, houve 118 genes upregulated e 214 genes downregulated. Devido ao baixo número de DEGs obtidos em cada uma das análises, não foi possível realizar a anotação no GO ou REACTOME.

A partir das amostras do estudo 2, foram identificados 216 DEGs (191 upregulated e 25 downregulated) majoritariamente atrelados ao ciclo celular. Através

da anotação do GO, os principais termos que descrevem estes DEGs são processo metabólico, regulação e reparo do DNA, manutenção da fase G2 e controle da mitose e meiose. Adicionalmente, nós observamos alteração na sinalização da via do interferon. Para identificar e categorizar as vias relacionadas a estes DEGs, foi utilizado o REACTOME. Através dessa base de dados, foram obtidas 523 vias de sinalização, sendo destas 111 estatisticamente significantes ($FDR < 0.05$). Entre as vias mais representativas, estão a do ciclo celular, da regulação transcricional através da TP53, do reparo do DNA e de checkpoints do ciclo celular, com *entities ratio* entre 4% e 0.1%.

Tendo como base o dataset do estudo 3, foram definidos 3 DEGs upregulated. Os genes OTOF (majoritariamente relacionado à surdez, OR2B6 (receptor olfatório) e ANKRD5 (sem grandes atribuições). Devido ao baixo número de DEGs, também não foi possível realizar a anotação no GO ou REACTOME.

4.3 META-ANÁLISE

4.3.1 Genes diferencialmente expressos

Após o processo de análise, foi possível identificar as principais alterações transcricionais entre os pacientes com COVID-19. O resultado das análises consiste em 1.022 DEGs, sendo 646 genes *upregulated* e 376 *downregulated*. A diversidade em relação a funcionalidade desses genes é esperada para dados de transcriptoma, especialmente em processos patológicos. Foi possível identificar 146 transcritos de imunoglobulina (como *IGHG3*, *IGHV2-70*, *IGLV3-25*) superexpressos, responsáveis majoritariamente por codificar as cadeias leves ou pesadas e promover a ligação ao antígeno. O gene *IGHA1* é responsável por ligar e captar ligantes através de receptores *scavenger* e já foi descrito em outros trabalhos como estando *uregulated* em pacientes covid-19.

Além disso, constatou-se uma elevada presença de genes envolvidos na sinalização de interferon como *IFI27*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1*, *IFIT3*, *IFIT5*, *IFI6*, *ISG15* e *IFIH1*. De forma geral, tais genes exercem diferentes papéis na resposta imune inata orquestrada mediante ativação da via de interferons.

Alguns outros genes induzidos por interferon também participam ativamente da resposta antiviral desencadeada pelo hospedeiro, como o *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *RSAD2*, *MX1*, *GBP1*, *GBP4*, *GBP6*, *TRIM6*.

Complementarmente, observou-se a expressão aumentada de outros genes importantes para a expressividade da resposta imunológica, como o *LTF*, que possui um amplo espectro de propriedades, incluindo a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas e ação anti-inflamatória. Por sua vez, o gene *XAF1* participa das vias de resposta ao IFN e impede a apoptose através da inibição das caspases. Quimiocinas e moléculas de adesão desempenham um papel primordial para resposta imune. Dentre as quimiocinas upregulated, encontramos *CCL2*, *CCL8*, *CXCL10*, *CXCL3*, *CXCL11*, enquanto *CEACAM6* e *CEACAM8* representam as moléculas de adesão super expressas.

A partir das nossas análises não foi possível identificar genes diretamente envolvidos na via da sinalização do inflamassoma, seus produtos ou as moléculas responsáveis por sua regulação.

4.3.2 Gene ontology

A partir da obtenção dos DEGs, é vantajoso uma posterior unificação e agrupamento a partir da função de cada um desses genes, a fim de visualizar de forma geral os principais termos que descrevem o dataset. Para tal, utilizamos o GO.

Conseguimos 796 termos no total, e 20 termos principais da rede de ontologia estão listados na tabela 4 e refletem a processos mais generalistas que ocorrem no hospedeiro. O termo “processo biológico” (GO:0008150) refere-se aos objetivos para os quais os organismos são geneticamente programados, como por exemplo a divisão celular, que requerem maquinaria molecular e são finamente regulados. Em contrapartida, “processo celular” (GO:0009987) faz alusão a eventos que não necessariamente ocorrem a nível de uma única célula, mas ocorrem a nível celular, como por exemplo a comunicação celular, que pode envolver mais de uma célula. “Resposta a estímulos” (GO:0050896) caracteriza as modificações subsequente a detecção/percepção de determinado estímulo, como por exemplo ativação, mudanças na expressão gênica ou secreção de algum produto). Por sua vez, o termo “processos do sistema imune” (GO:0002376) refere-se a qualquer modificação do sistema imune, especialmente em resposta a modificações internas e potenciais invasores.

Tabela 4 – 20 termos mais representativos demonstram a presença marcante de processos atrelados ao ciclo celular

IDs GO	Termo	p-valor
GO:0008150	Processo biológico	1,38115E-20
GO:0009987	Processo celular	8,8996E-14
GO:0065007	Regulação biológica	6,47329E-15
GO:0050789	Regulação de processos biológicos	3,66146E-15
GO:0050794	Regulação de processos celulares	4,10405E-19
GO:0050896	Resposta a estímulos	1,2261E-38
GO:0051716	Resposta celular à estímulos	1,74072E-26
GO:0051179	Localização	5,9842E-20
GO:0007154	Comunicação celular	9,17141E-21
GO:0023052	Sinalização	5,49222E-21
GO:0048518	Regulação positiva de processos biológicos	5,3214E-23
GO:0071840	Biogênese ou organização de componente celular	2,27902E-16
GO:0016043	Organização de componente celular	3,99268E-18
GO:0007165	Transdução de sinal	2,02198E-19
GO:0032501	Processo multicelular do organismo	7,83345E-05
GO:0051234	Estabelecimento da localização	6,77274E-20
GO:002376	Processos do sistema imune	2,85385E-55
GO:0048522	Regulação positiva de processo celular	3,07746E-12
GO:0006810	Transporte	1,25007E-15
GO:0032502	Processo de desenvolvimento	0,003009535

Apesar disso, os demais resultados apontam a importante presença do sistema imunológico no dataset. Especificando os resultados relacionados ao interferon, temos: resposta ao interferon gamma (GO:0034341); resposta celular ao interferon gamma (GO:0071346); resposta ao interferon tipo 1 (GO: 0034340); via de sinalização do interferon tipo 1 (GO: 0060337); resposta celular ao interferon tipo 1 (GO:0071357); via de sinalização mediada por interferon-gamma (GO:0060333); resposta ao interfeon-alfa (0035455).

4.3.3 Reactoma

Adicionalmente à ontologia dos DEGs, a investigação de como os genes estão enriquecidos para determinada via biológica é fundamental para aumentar a compreensão dos fenômenos que acontecem no hospedeiro. Portanto, a partir dos DEGs obtidos de pacientes COVID-19 em comparação ao grupo controle, realizamos o Reactoma.

A partir desta análise, foram encontradas 117 vias de sinalização estatisticamente significativas, majoritariamente atreladas ao ciclo celular. Dentre as 10 vias mais representativas (tabela 5), estão a de checkpoint do ciclo celular (R-HSA-69620, Gene Ratio 44/445), de sinalização de interferons (R-HSA-913531, Gene Ratio 29/445) e de reparo do DNA (R-HSA-73894, Gene Ratio 25/445). Dentre as vias menos representativas, foi possível constatar a presença de fatores envolvidos no desenvolvimento de megacariócitos e produção de plaquetas (R-HSA-983231, Gene Ratio 16/445), Sinalização do interferon gamma (R-HSA-877300, Gene Ratio 15/445), e Formação da beta-catenina: transativação do complexo TCF (R-HSA-201772, Gene Ratio 13/445).

Tabela 5 – Vias de sinalização mais representativas de acordo com o Reactome.

ID	Descrição	GeneRatio	p-valor	p-ajustado
R-HSA-69620	Checkpoints do ciclo celular	44/445	9,1259E-14	7,8483E-11
R-HSA-194315	Signalização por Rho GTPases	43/445	3,8081E-07	2,0518E-05
R-HSA-68886	Fase M	41/445	2,6862E-07	1,777E-05
R-HSA-195258	Efetores RHO GTPase	36/445	8,7549E-08	7,4933E-06
R-HSA-913531	Sinalização de interferons	29/445	2,6644E-09	7,638E-07
R-HSA-73894	DNA Repair	25/445	0,00335229	0.02745689
R-HSA-69481	Checkpoints G2/M	24/445	1,1525E-07	8,2596E-06
R-HSA-68877	Prometáfase mitótica	24/445	4,1449E-06	0,00011823
R-HSA-68882	Anáfase mitótica	24/445	4,8347E-05	0,00092946
R-HSA-2555396	Mitotic Metaphase and Anaphase	24/445	5,1753E-05	0,00094698

5 DISCUSSÃO

As divergências entre os prognósticos dos pacientes com COVID-19 é um fator central para o entendimento da fisiopatologia da doença. Especificar/detalhar os mecanismos responsáveis pela variação de sintomas (que vai desde o quadro assintomático até a síndrome respiratória severa e falência múltipla de órgão) é fundamental não apenas para o combate da crise atual, mas para expandir nosso conhecimento sobre infecções virais e nos estruturar para outras possíveis epidemias futuras. Portanto, visando elucidar pontos importantes sobre a interação vírus-hospedeiro compreender a variabilidade clínica dos pacientes, foi conduzida uma meta-análise com dados públicos de RNA-seq para identificar os genes diferencialmente expressos e as vias de sinalização em indivíduos positivo para a COVID-19.

Surpreendentemente, dentre as modificações na expressão gênica causadas pelo SARS-CoV-2, há proporcionalmente poucos genes diretamente relacionados à inflamação. Entretanto, é fundamental ressaltar que a cinética da doença é altamente dinâmica, capaz de interferir em diversos aspectos biológicos, e os resultados da maioria dos estudos tendem a refletir o intervalo de tempo em que as amostras foram coletadas. Além disso, quando se fala em transcriptoma, é interessante averiguar os genes que são induzidos em resposta as citocinas, e não os genes das citocinas em si (LEE, J. S. *et al.*, 2020).

Dentre os DEGs que participam do processo inflamatório, as quimiocinas CCL2 e CXCL10 foram fortemente relacionadas ao perfil transcriptômico hiper inflamatório dos pacientes COVID-19 (XIONG, Y. *et al.*, 2020). Além dessas, as quimiocinas CCL8, CXCL3 e CXCL11 também foram descritas em outros estudos não apenas como superexpressas, mas como responsável por diferenciar os quadros críticos dos casos moderados (CHUA *et al.*, 2020).

Este aumento na expressão de quimicinas é um processo sistematizado em resposta à infecção, como uma tentativa local de minimizar os danos causados pelo SARS-CoV-2. Contudo, a resposta inflamatória passa a escalonar e torna-se sistêmica, resultando no aumento de transcritos. Nossos resultados estão de acordo com o consenso da comunidade científica, que estabeleceu a inflamação como marcador da COVID-19.

O amplo espectro da resposta imunológica requer diversos componentes, e caracterizá-los no contexto na COVID-19 pode ampliar estratégias de desenvolvimento de medicamentos ou adjuvantes terapêuticos. Dentre os DEGs obtidos em nossas análises, detectamos o aumento da expressão do gene LTF, responsável por codificar a lactoferrina. Essa proteína desempenha diversos papéis no organismo e foi descrita como um dos biomarcadores solúveis atrelados à mortalidade em uma coorte de 175 pacientes positivos para COVID-19 (ABERS *et al.*, 2021). Embora nossos resultados sejam correspondentes aos achados de outros estudos, é fundamental realizar investigações adicionais, com uma maior diversidade de pacientes, para elucidar o vínculo entre o gene LTF e o maior risco do desenvolvimento de quadros severos.

Pensando ainda sobre o processo inflamatório durante a COVID-19, a ativação do inflamassoma tem sido apontado como um dos indutores da tempestade de citocinas, levando aos quadros mais graves que acomete aproximadamente 15% dos pacientes (ELHABYAN, Abdelazeem *et al.*, 2020). Foi previamente demonstrado a ativação de NLRP3 enquanto influenciador do desfecho clínico e correlacionado com os principais marcadores de severidade da doença (RODRIGUES, T. S. *et al.*, 2020). Aqui, os nossos resultados não apontam para uma participação significativa do inflamassoma na evolução e/ou prognóstico da COVID-19, mas tal complexo proteico requer atenção e são necessário estudos mais robustos para correlacionar o inflamassoma à severidade da infecção por SARS-CoV-2.

De acordo com os nossos resultados, tem-se o aumento da expressão do gene *XAF1* em indivíduos COVID-19 quando comparados com o grupo controle. Esse resultado é capaz de apresentar outros fatores que são relevantes para a composição do perfil transcricional dos pacientes. Até o momento, a literatura descreve o ISG *XAF1* como significativamente aumentado em pacientes severos em comparação a pacientes leves ou ao grupo controle, e que se acredita na participação deste gene no processo apoptótico de células T, resultando em linfopenia, uma característica marcante da doença (ZIEGLER *et al.*, 2020).

A indução de apoptose e modificação das vias de sinalização da p53 promovidas pelo SARS-CoV-2 é um ponto alarmante. O aumento da expressão dos genes *CCNB1*, *CCNB2*, *GTSE1*, *CDK1*, *RRM2* e *BIRC5* observado em nossos resultados é discutido por outros autores como sendo um dos fatores responsáveis

pela linfopenia em pacientes COVID-19 (ALLEGRA *et al.*, 2020; XIONG, Y. *et al.*, 2020).

Em indivíduos com quadro leve, a anosmia é bastante prevalente. O mecanismo do desenvolvimento desse sintoma e suas consequências a longo prazo ainda não estão totalmente descritos. Entretanto, acredita-se que a perda do olfato é resultante de um processo inflamatório que ocorre no epitélio nasal, promovendo dano no sistema olfatório (HAN, A. Y. *et al.*, 2020). Até o momento, a expressão de genes diretamente relacionados a esse fenômeno permanece desconhecido, entretanto, a super expressão do gene *OR2B6* que codifica um receptor olfatório responsável pela percepção de cheiros pode estar envolvida nesse processo.

Um ponto de convergência entre os resultados individuais dos datasets analisados e a nossa meta-análise é a super expressão do gene *OTOF*, convencionalmente relacionado à surdez. Análises computacionais identificaram esse gene como um marcador da infecção por Rhinovirus, um dos agentes etiológicos da gripe comum, portanto, há a possibilidade de um mecanismo similar ocorrer com o SARS-CoV-2, mas são necessários outros estudos para validar esta hipótese (XU, Y. *et al.*, 2020).

Por meio da análise de enriquecimento, observamos que os principais termos que caracterizam os DEGs refletem a variabilidade das respostas que são geradas a partir da interação patógeno-hospedeiro e podem auxiliar a elucidar os eventos subsequentes à entrada do SARS-CoV-2 na célula, e influência no desenvolvimento da COVID-19. Dentre dez as vias mais representativas obtidas no Reactome, sete referem-se à processos do ciclo celular, destacando um ponto importante a ser explorado. Os coronavírus são descritos como altamente capazes de promover alterações no microambiente celular do hospedeiro para obter um ambiente adequado para sua replicação, o que justifica tais alterações (ENJUANES *et al.*, 2006).

Apesar de haver algumas contradições sobre o status da resposta aos interferons nos pacientes, nosso trabalho identificou a presença robusta de ISGs, resultando na via “sinalização do interferon” como uma das mais representativas entre os pacientes. O sequenciamento do exoma de 659 pacientes COVID-19 e 534 indivíduos assintomáticos demonstrou uma resposta de interferons defeituosa, associada com erros inatos nos receptores TLR7 e IRF7, e que esse enfraquecimento da resposta leva a piores desfechos da doença e aumento no risco de vida. (ZHANG, Qian *et al.*, 2020).

O número de DEGs estimulados por interferon e os envolvidos diretamente na via de interferons somam-se à outras evidências científicas que descrevem a robusta interferência da superativação de IFNs na heterogeneidade de pacientes positivos para a COVID-19. Há uma provável correlação entre a carga viral do indivíduo e o aumento de expressão de IFNa e IFNg, onde o organismo utiliza a maquinaria celular e molecular para retardar a replicação viral, entretanto, esse processo é ineficiente e, somado ao fenótipo inflamatório, acarreta em diversos danos ao hospedeiro (LUCAS *et al.*, 2020). Níveis elevados de IFN já foram discutidos como estando conectado a mortalidade de pacientes, visto que estes apresentavam mais citocina circulando desde as fases iniciais da doença.

Os genes da defesa antiviral inata, como os genes OAS, desempenham uma importante função, especialmente nas fases iniciais da doença, por codificarem enzimas que ativam mediadores contra o vírus (RNAse L) para degradação do RNA viral e impedir a tradução de proteínas virais. Análises single-cell do lavado bronco alveolar de pacientes críticos - quando comparado com pacientes leves - apresentou um fenótipo de neutrófilo que expressa a proteína N do vírus, e tais neutrófilos super expressam genes antivirais (WAUTERS, E. *et al.*, 2021).

Outro fator capaz de ajudar no entendimento da correlação entre a exacerbação da resposta aos interferons e o quadro clínico dos indivíduos envolve a ativação de ISGs não-canônicos, também envolvidos na contenção do espalhamento e replicação viral. Surpreendentemente, estudos recentes apontaram a IL-6 e o receptor ACE-2 como sendo ISG não-canônico, o que deixa aberta a possibilidade da sua ativação em um estágio mais tardio da doença, sustentando a expressão da via de interferons e seguido de danos ao hospedeiro em decorrência da super expressão desses ISGs, que sabidamente influenciam negativamente o curso clínico/prognóstico (BUSNADIEGO *et al.*, 2020; ZIEGLER *et al.*, 2020).

Estes achados demonstram a complexidade da interação patógeno-hospedeiro e a sua repercussão para o desfecho clínico dos pacientes. Entretanto, nosso estudo possui limitações por conta do baixo número de estudos incluídos após os critérios de inclusão, e a meta-análise contém apenas amostras de sangue periférico.

Considerando todos os resultados discutidos até então, é possível traçar elementos centrais da resposta do hospedeiro à infecção por SARS-CoV-2 que interferem no desenvolvimento do quadro clínico da COVID-19. As defesas antivirais do organismo que envolvem a super expressão de IFNs e ISGs promovem um fenótipo

mais severo da COVID-19 através da exacerbação da inflamação e sobreposição com outras vias do sistema imunológico, evidenciando um possível papel patológico das defesas do hospedeiro – que ocorre em outras doenças –, desencadeada nos estágios mais iniciais da infecção (GILL *et al.*, 2020; LUCAS *et al.*, 2020; SHAATH *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra a complexidade da interação patógeno-hospedeiro e sua implicação no quadro clínico de indivíduos positivos para o SARS-CoV-2.

Foi possível observar que o perfil dos pacientes graves envolve uma intensa resposta a interferons (ISG15, IFI44L, IFIT1, IFIT3) bem como o aumento na expressão de genes antivirais (OAS3, RSAD2, MX1, GBP4) que se relacionam com outras cascatas imunológicas e ampliam a resposta pró-inflamatória. A partir das nossas análises, não foi possível identificar evidências robustas que apontem a participação do inflamassoma no prognóstico dos pacientes. Além disso, observou-se a notável presença de vias relacionadas ao ciclo celular, evidenciando um importante mecanismo de interação patógeno-hospedeiro.

Os achados apresentam processos biológicos heterogêneos que coexistem nos pacientes e podem interferir na diversidade de sintomas apresentados na COVID-19. Acreditamos que os resultados podem contribuir para o esclarecimento da complexidade de respostas sistêmicas determinantes para o prognóstico do indivíduo, bem como auxiliar o desenvolvimento de terapias mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- ABERS, M. S. *et al.* An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. **JCI Insight**, 11 jan. 2021. v. 6, n. 1, p. 1–20. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/144455>>.
- AGGARWAL, S. *et al.* Role of Multiomics Data to Understand Host–Pathogen Interactions in COVID-19 Pathogenesis. **Journal of Proteome Research**, 5 fev. 2021. v. 20, n. 2, p. 1107–1132. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.0c00771>>.
- ALLEGRA, A. *et al.* Immunopathology of SARS-CoV-2 Infection: Immune Cells and Mediators, Prognostic Factors, and Immune-Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, 6 jul. 2020. v. 21, n. 13, p. 4782. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/13/4782>>.
- AMARANTE-MENDES, G. P. *et al.* Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. **Frontiers in Immunology**, 16 out. 2018. v. 9, n. OCT, p. 1–19. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02379/full>>.
- ANWAR, M. A. *et al.* Recent clinical trends in Toll-like receptor targeting therapeutics. **Medicinal Research Reviews**, 18 maio. 2019. v. 39, n. 3, p. 1053–1090. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/med.21553>>.
- ARIMOTO, K.-I. *et al.* Negative regulation of type I IFN signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, jun. 2018. v. 103, n. 6, p. 1099–1116. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/JLB.2MIR0817-342R>>.
- BARAN, P. *et al.* The balance of interleukin (IL)-6, IL-6soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6sIL-6Rsgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 2018. v. 293, n. 18, p. 6762–6775.
- BLANCO-MELO, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, 2020. v. 181, n. 5, p. 1036–1045.e9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.026>>.
- BORTHWICK, L. A. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. **Seminars in Immunopathology**, 2016. v. 38, n. 4, p. 517–534. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00281-016-0559-z>>.
- BORTOLOTTI, P.; FAURE, E.; KIPNIS, E. Inflammasomes in tissue damages and immune disorders after trauma. **Frontiers in Immunology**, 2018. v. 9, n. AUG, p. 1–17.
- BUSNADIEGO, I. *et al.* Antiviral Activity of Type I, II, and III Interferons Counterbalances ACE2 Inducibility and Restricts SARS-CoV-2. **mBio**, 27 out. 2020. v. 11, n. 5, p. 1–10. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01928-20>>.
- CALCAGNILE, M. *et al.* Molecular docking simulation reveals ACE2 polymorphisms that may increase the affinity of ACE2 with the SARS-CoV-2 Spike protein. **Biochimie**, 2021. v. 180, p. 143–148. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.004>>.
- CARMO, A. *et al.* Clearance and persistence of SARS-CoV-2 RNA in patients with

COVID-19. **Journal of Medical Virology**, 19 out. 2020. v. 92, n. 10, p. 2227–2231. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26103>>.

CARSANA, L. *et al.* Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020. v. 20, n. 10, p. 1135–1140. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30434-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30434-5)>.

CHANCHAL, S. *et al.* Understanding Inflammatory Responses in the Manifestation of Prothrombotic Phenotypes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 14 fev. 2020. v. 8, n. February, p. 1–8. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00073/full>>.

CHANNAPPANAVAR, R. *et al.* Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. **Cell Host and Microbe**, 2016. v. 19, n. 2, p. 181–193. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.007>>.

CHEN, C.-J.; MAKINO, S. Murine Coronavirus Replication Induces Cell Cycle Arrest in G 0 /G 1 Phase . **Journal of Virology**, 2004. v. 78, n. 11, p. 5658–5669.

CHEN, J. *et al.* RIP3 dependent NLRP3 inflammasome activation is implicated in acute lung injury in mice. **Journal of Translational Medicine**, 2018. v. 16, n. 1, p. 1–12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1606-4>>.

CHEN, K. W.; DEMARCO, B.; BROZ, P. Beyond inflammasomes: emerging function of gasdermins during apoptosis and NETosis. **The EMBO Journal**, 2020. v. 39, n. 2, p. 1–11.

CHEN, Yan-Mei *et al.* Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage. **The EMBO Journal**, 15 dez. 2020. v. 39, n. 24, p. 1–23. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emboj.2020105896>>.

CHUA, R. L. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nature Biotechnology**, 2020. v. 38, n. 8, p. 970–979. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41587-020-0602-4>>.

CHUNG, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, 2 jul. 2001. v. 18, n. 1, p. 50–59. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.01.00229701>>.

CONNORS, J. M.; LEVY, J. H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. **Blood**, 2020. v. 135, n. 23, p. 2033–2040.

CONTOLI, M. *et al.* Blood Interferon- α Levels and Severity, Outcomes, and Inflammatory Profiles in Hospitalized COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, 9 mar. 2021. v. 12. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.648004/full>>.

CROW, M. K.; RONNBLOM, L. Type I interferons in host defence and inflammatory diseases. **Lupus Science & Medicine**, 28 maio. 2019. v. 6, n. 1, p. e000336. Disponível em: <<https://lupus.bmj.com/lookup/doi/10.1136/lupus-2019-000336>>.

D'ARIENZO, M.; CONIGLIO, A. Assessment of the SARS-CoV-2 basic reproduction number, R₀, based on the early phase of COVID-19 outbreak in Italy. **Biosafety and**

Health, jun. 2020. v. 2, n. 2, p. 57–59. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590053620300410>>.

DENIS, M. M. *et al.* Escaping the nuclear confines: Signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. **Cell**, 2005. v. 122, n. 3, p. 379–391.

DESAI, N. *et al.* Temporal and spatial heterogeneity of host response to SARS-CoV-2 pulmonary infection. **Nature Communications**, 9 dez. 2020. v. 11, n. 1, p. 6319. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20139-7>>.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, 2018. v. 281, n. 1, p. 8–27.

DING, L. *et al.* TGEV nucleocapsid protein induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of p53 signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014. v. 445, n. 2, p. 497–503. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.039>>.

DOLINAY, T. *et al.* Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2012. v. 185, n. 11, p. 1225–1234.

DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020. v. 20, n. 5, p. 533–534. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)>.

DONNIK, I. M. *et al.* Coronavirus Infections of Animals: Future Risks to Humans. **Biology Bulletin**, 2021. v. 48, n. 1, p. 26–37.

DURMUS, S. *et al.* A review on computational systems biology of pathogen-host interactions. **Frontiers in Microbiology**, 2015. v. 6, n. APR, p. 1–19.

ELHABYAN, Abdelazeem *et al.* The role of host genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and insights into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. **Virus Research**, 2020. v. 289, n. September, p. 198163. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198163>>.

ENJUANES, L. *et al.* Biochemical Aspects of Coronavirus Replication and Virus-Host Interaction. **Annual Review of Microbiology**, out. 2006. v. 60, n. 1, p. 211–230. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.60.080805.142157>>.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2018. v. 319, n. 7, p. 698–710.

FAN, Y. Y. *et al.* Characterization of SARS-CoV-specific memory T cells from recovered individuals 4 years after infection. **Archives of Virology**, 2009. v. 154, n. 7, p. 1093–1099.

FEHR, A. R. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. New York, NY: **Coronaviruses: Methods and Protocols**, 2015. Methods in Molecular Biology. v. 1282, n. 1, p. 1–282. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2438-7>>.

FENINI, G.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. Potential of IL-1, IL-18 and

inflammasome inhibition for the treatment of inflammatory skin diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 2017. v. 8, n. MAY, p. 1–20.

FERREIRA, A. C. *et al.* SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discovery**, 2021. v. 7, n. 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41420-021-00428-w>>.

FU, J. *et al.* The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. **Thrombosis Research**, 2020. v. 192, n. January, p. 3–8.

GASSE, P. *et al.* IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 2007. v. 117, n. 12, p. 3786–3799.

GHAZAVI, A. *et al.* Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**, jan. 2020. v. 137, n. January, p. 155323. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466620303392>>.

GIBELIN, A. *et al.* Acute respiratory distress syndrome mimickers lacking common risk factors of the Berlin definition. **Intensive Care Medicine**, 2016. v. 42, n. 2, p. 164–172.

GILL, S. E. *et al.* Transcriptional profiling of leukocytes in critically ill COVID19 patients: implications for interferon response and coagulation. **Intensive Care Medicine Experimental**, 11 dez. 2020. v. 8, n. 1, p. 75. Disponível em: <<https://icm-experimental.springeropen.com/articles/10.1186/s40635-020-00361-9>>.

GIRIJA, A. S. S.; SHANKAR, E. M.; LARSSON, M. Could SARS-CoV-2-Induced Hyperinflammation Magnify the Severity of Coronavirus Disease (CoViD-19) Leading to Acute Respiratory Distress Syndrome? **Frontiers in immunology**, 2020. v. 11, n. May, p. 1206.

GRAILER, J. J. *et al.* Critical Role for the NLRP3 Inflammasome during Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, 2014. v. 192, n. 12, p. 5974–5983.

GUPTA, N. *et al.* Activation of NLRP3 inflammasome complex potentiates venous thrombosis in response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2 maio. 2017. v. 114, n. 18, p. 4763–4768. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1620458114>>.

HADJADJ, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, 7 ago. 2020. v. 369, n. 6504, p. 718–724. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abc6027>>.

HAMMING, O. J. *et al.* Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. **The EMBO Journal**, 27 nov. 2013. v. 32, n. 23, p. 3055–3065. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2013.232>>.

HAN, A. Y. *et al.* Anosmia in COVID-19: Mechanisms and Significance. **Chemical Senses**, 7 jul. 2020. v. 45, n. 6, p. 423–428. Disponível em: <<https://academic.oup.com/chemse/article/45/6/423/5859163>>.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, 2020. v. 41, n. 12, p. 1100–1115.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>>.

HASÖKSÜZ, M.; KILIÇ, S.; SARAÇ, F. Coronaviruses and SARS-COV-2. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, 21 abr. 2020. v. 50, n. SI-1, p. 549–556. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-20-50-si-1/sag-50-si-1-10-2004-127.pdf>>.

HENZINGER, H. *et al.* Non-Coding RNAs and SARS-Related Coronaviruses. **Viruses**, 1 dez. 2020. v. 12, n. 12, p. 1374. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/12/1374>>.

HEROLD, T. *et al.* Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, jul. 2020. v. 146, n. 1, p. 128- 136.e4. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674920306850>>.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, 2020. v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8.

HOTTZ, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. **Blood**, 2013. v. 122, n. 20, p. 3405–3414.

HU, Z. J. *et al.* Lower Circulating Interferon-Gamma Is a Risk Factor for Lung Fibrosis in COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, 2020. v. 11, n. September, p. 1–3.

HUANG, K. J. *et al.* An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. **Journal of Medical Virology**, 2005. v. 75, n. 2, p. 185–194.

IVASHKIV, L. B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, 19 set. 2018. v. 18, n. 9, p. 545–558. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41577-018-0029-z>>.

JO, E.-K. *et al.* Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular & Molecular Immunology**, 9 mar. 2016. v. 13, n. 2, p. 148–159. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cmi201595>>.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews Rheumatology**, 10 jan. 2016. v. 12, n. 1, p. 49–62. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrrheum.2015.169>>.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, 2020. v. 19, n. March, p. 100682. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>>.

KIM, W. Y.; HONG, S. B. Sepsis and acute respiratory distress syndrome: Recent update. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, 2016. v. 79, n. 2, p. 53–57.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, nov. 2020. v. 85, n. January, p. 104502. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820303336>>.

KLOK, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients

with COVID-19. **Thrombosis Research**, jul. 2020. v. 191, n. January, p. 145–147. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049384820301201>>.

KNOOPS, K. *et al.* SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. **PLoS Biology**, 16 set. 2008. v. 6, n. 9, p. e226. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0060226>>.

KOPITAR-JERALA, N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. **Frontiers in Immunology**, 25 jul. 2017. v. 8, n. JUL. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00873/full>>.

LAI, A. L. *et al.* Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. **the Lancet**, 2020. v. 395, n. April, p. 1315.

LARA, P. C.; MACÍAS-VERDE, D.; BURGOS-BURGOS, J. Age-induced NLRP3 Inflammasome Over-activation Increases Lethality of SARS-CoV-2 Pneumonia in Elderly Patients. **Aging and disease**, 2020. v. 11, n. 4, p. 756. Disponível em: <<http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2020.0601>>.

LAZEAR, H. M.; SCHOGGINS, J. W.; DIAMOND, M. S. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. **Immunity**, abr. 2019. v. 50, n. 4, p. 907–923. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>>.

LECHOWICZ, K. *et al.* COVID-19: The Potential Treatment of Pulmonary Fibrosis Associated with SARS-CoV-2 Infection. **Journal of Clinical Medicine**, 19 jun. 2020. v. 9, n. 6, p. 1917. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/9/6/1917>>.

LEE, J. S. *et al.* Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Science Immunology**, 10 jul. 2020. v. 5, n. 49, p. eabd1554. Disponível em: <<https://immunology.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciimmunol.abd1554>>.

_____; SHIN, E.-C. The type I interferon response in COVID-19: implications for treatment. **Nature Reviews Immunology**, 12 out. 2020. v. 20, n. 10, p. 585–586. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00429-3>>.

LI, S. *et al.* SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 9 dez. 2020. v. 5, n. 1, p. 235. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00334-0>>.

LI, X. *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2020. v. 10, n. 2, p. 102–108. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>>.

LIPPI, G.; PLEBANI, M.; HENRY, B. M. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. **Clinica Chimica Acta**, 2020. v. 506, n. March, p. 145–148. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.022>>.

LUCAS, C. *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, 20 ago. 2020. v. 584, n. 7821, p. 463–469. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41586-020-2588-y>>.

MACHHI, J. *et al.* A Role for Extracellular Vesicles in SARS-CoV-2 Therapeutics and Prevention. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 2021. v. 16, n. 2, p. 270–

288.

MAJOR, J. *et al.* Type I and III interferons disrupt lung epithelial repair during recovery from viral infection. **Science**, 7 ago. 2020. v. 369, n. 6504, p. 712–717. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abc2061>>.

MAKRIS, S.; PAULSEN, M.; JOHANSSON, C. Type I Interferons as Regulators of Lung Inflammation. **Frontiers in Immunology**, 10 mar. 2017. v. 8, n. March, p. 1–10. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00259/full>>.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-b. **Molecular Cell**, ago. 2002. v. 10, n. 2, p. 417–426. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502005993>>.

MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, jan. 2018. v. 101, n. 1, p. 14–18. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466616304501>>.

MENTER, T. *et al.* Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. **Histopathology**, 2020. v. 77, n. 2, p. 198–209.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, 2020. v. 20, n. 6, p. 355–362.

MESEV, E. V.; LEDESMA, R. A.; PLOSS, A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. **Nature Microbiology**, 1 jun. 2019. v. 4, n. 6, p. 914–924. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0421-x>>.

MIDDLETON, E. A. *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Blood**, 3 set. 2020. v. 136, n. 10, p. 1169–1179. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/136/10/1169/461219/Neutrophil-extracellular-traps-contribute-to>>.

NIETO-TORRES, J. L. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. **PLoS Pathogens**, 2014. v. 10, n. 5.

_____. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. **Virology**, 2015. v. 485, p. 330–339. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.010>>.

OVERMYER, K. A. *et al.* Large-Scale Multi-omic Analysis of COVID-19 Severity. **Cell Systems**, jan. 2021. v. 12, n. 1, p. 23–40.e7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.10.003>>.

OZONO, S. *et al.* SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. **Nature Communications**, 8 dez. 2021. v. 12, n. 1, p. 848. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21118-2>>.

PACES, J. *et al.* COVID-19 and the Immune System. 2020. v. 9973, p. 379–388.

PAIN, C. E. *et al.* Novel paediatric presentation of COVID-19 with ARDS and cytokine storm syndrome without respiratory symptoms. **The Lancet Rheumatology**, jul. 2020. v. 2, n. 7, p. e376–e379. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2665991320301375>>.

PAULES, C. I.; MARSTON, H. D.; FAUCI, A. S. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. **JAMA**, 25 fev. 2020. v. 323, n. 8, p. 707. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=_DDwCqx6wpcC&printsec=frontcover&dq=unwritten+rules+of+phd+research&hl=&cd=1&source=gbs_api%255Cnpapers2://publication/uuid/48967E01-55F9-4397-B941-310D9C5405FA%255Cnhttp://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.p>.

PINKERTON, J. W. *et al.* Inflammasomes in the lung. **Molecular Immunology**, jun. 2017. v. 86, p. 44–55. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589017300202>>.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. **Frontiers in Microbiology**, 2021. v. 11, n. January.

PLATNICH, J. M.; MURUVE, D. A. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, jul. 2019. v. 670, n. February, p. 4–14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>>.

QIN, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients with COVID-19 in Wuhan, China. **SSRN Electronic Journal**, 2020. Disponível em: <<https://www.ssrn.com/abstract=3541136>>.

RABI, F. A. *et al.* Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. **Pathogens**, 2020. v. 9, n. 3, p. 1–14.

RANIERI, V. M. *et al.* Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, 2012. v. 307, n. 23, p. 2526–2533.

RAPKIEWICZ, A. V. *et al.* Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: A case series. **EClinicalMedicine**, 2020. v. 24. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100434>>.

REISS, L. K.; SCHUPPERT, A.; UHLIG, S. Inflammatory processes during acute respiratory distress syndrome: A complex system. **Current Opinion in Critical Care**, 2018. v. 24, n. 1, p. 1–9.

REN, Y. *et al.* The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. **Cellular and Molecular Immunology**, 2020. v. 17, n. 8, p. 881–883.

REX, D. A. . *et al.* A comprehensive pathway map of IL-18-mediated signalling. **Journal of Cell Communication and Signaling**, 20 jun. 2020. v. 14, n. 2, p. 257–266. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12079-019-00544-4>>.

RIOS, R. S.; ZHENG, K. I.; ZHENG, M.-H. Data sharing during COVID-19 pandemic: what to take away. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, 1 dez. 2020. v. 14, n. 12, p. 1125–1130. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17474124.2020.1815533>>.

ROBSON, F. *et al.* Coronavirus RNA Proofreading: Molecular Basis and Therapeutic Targeting. **Molecular Cell**, set. 2020. v. 79, n. 5, p. 710–727. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276520305189>>.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, 2020. v. 218, n. 3.

ROGERS, A. J. *et al.* Association of Elevated Plasma Interleukin-18 Level With Increased Mortality in a Clinical Trial of Statin Treatment for Acute Respiratory Distress Syndrome*. **Critical Care Medicine**, 2019. v. 47, n. 8, p. 1089–1096.

ROH, J. S.; SOHN, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. **Immune Network**, 2018. v. 18, n. 4, p. 1–14. Disponível em: <<https://immunenetwork.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2018.18.e27>>.

SANTERRE, M. *et al.* Why do SARS-CoV-2 NSPs rush to the ER? **Journal of Neurology**, 1 jun. 2021. v. 268, n. 6, p. 2013–2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00415-020-10197-8>>.

SCHAEFER, I. M. *et al.* In situ detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. **Modern Pathology**, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41379-020-0595-z>>.

SCHINDLER, C.; LEVY, D. E.; DECKER, T. JAK-STAT signaling: From interferons to cytokines. **Journal of Biological Chemistry**, 2007. v. 282, n. 28, p. 20059–20063. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R700016200>>.

SCHÖNRICH, G.; RAFTERY, M. J.; SAMSTAG, Y. Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression. **Advances in Biological Regulation**, ago. 2020. v. 77, n. June, p. 100741. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221249262030052X>>.

SHAATH, H. *et al.* Single-Cell Transcriptome Analysis Highlights a Role for Neutrophils and Inflammatory Macrophages in the Pathogenesis of Severe COVID-19. **Cells**, 29 out. 2020. v. 9, n. 11, p. 2374. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/11/2374>>.

SHAH, A. Novel Coronavirus-Induced NLRP3 Inflammasome Activation: A Potential Drug Target in the Treatment of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, 2020. v. 11, n. May, p. 1–5.

SHI, C. S. *et al.* SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. **Cell Death Discovery**, 2019. v. 5, n. 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41420-019-0181-7>>.

SILVA, R. P. DA *et al.* Circulating Type I Interferon Levels and COVID-19 Severity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Immunology**, 2021. v. 12, n. May, p. 1–11.

SIU, K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome Coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. **The FASEB Journal**, 29 ago. 2019. v. 33, n. 8, p. 8865–8877. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.201802418R>>.

SNIJDER, E. J. *et al.* Unique and Conserved Features of Genome and Proteome of SARS-coronavirus, an Early Split-off From the Coronavirus Group 2 Lineage. **Journal of Molecular Biology**, ago. 2003. v. 331, n. 5, p. 991–1004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603008659>>.

SPALLUTO, C. M. *et al.* IFN- γ Influences Epithelial Antiviral Responses via Histone Methylation of the RIG-I Promoter. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, out. 2017. v. 57, n. 4, p. 428–438. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/10.1165/rcmb.2016-0392OC>>.

SPOLSKI, R.; LI, Peng; LEONARD, W. J. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. **Nature Reviews Immunology**, 8 out. 2018. v. 18, n. 10, p. 648–659. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0046-y>>.

SU, M. *et al.* A Mini-Review on Cell Cycle Regulation of Coronavirus Infection. **Frontiers in Veterinary Science**, 2020. v. 7.

SURJIT, M. *et al.* The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, 2006. v. 281, n. 16, p. 10669–10681.

TAHVILDARI, M.; DANA, R. Low-Dose IL-2 Therapy in Transplantation, Autoimmunity, and Inflammatory Diseases. **The Journal of Immunology**, 1 dez. 2019. v. 203, n. 11, p. 2749–2755. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1900733>>.

TAN, A. T. *et al.* Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. **Cell Reports**, 2021. v. 34, n. 6, p. 108728. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108728>>.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. **Immunotherapy**, 2016. v. 8, n. 8, p. 959–970.

TANG, F. *et al.* Lack of Peripheral Memory B Cell Responses in Recovered Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A Six-Year Follow-Up Study. **The Journal of Immunology**, 2011. v. 186, n. 12, p. 7264–7268.

TEIJARO, J. R. Pleiotropic Roles of Type 1 Interferons in Antiviral Immune Responses. [S.l.]: [s.n.], 2016, p. 135–158.

THACHIL, J. *et al.* ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2020. n. March, p. 1023–1026.

TIAN, S. *et al.* Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. **Modern Pathology**, 2020. v. 33, n. 6, p. 1007–1014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41379-020-0536-x>>.

TOLDO, S. *et al.* Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. **Inflammation Research**, 20 jan. 2021. v. 70, n. 1, p. 7–10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00011-020-01413-2>>.

TRANTAFILOU, K.; TRANTAFILOU, M. Ion flux in the lung: Virus-induced

inflammasome activation. **Trends in Microbiology**, 2014. v. 22, n. 10, p. 580–588. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.06.002>>.

VIDYA, M. K. *et al.* Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. **International Reviews of Immunology**, 2 jan. 2018. v. 37, n. 1, p. 20–36. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>>.

VIJAYVARGIYA, P. *et al.* Treatment Considerations for COVID-19: A Critical Review of the Evidence (or Lack Thereof). **Mayo Clinic Proceedings**, 2020. v. 95, n. 7, p. 1454–1466. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.027>>.

WALLS, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, 2020. v. 181, n. 2, p. 281–292.e6.

WANG, F. *et al.* Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in covid-19 pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, 2020. v. 221, n. 11, p. 1762–1769.

WANG, J. *et al.* Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**, 13 jul. 2020. v. 108, n. 1, p. 17–41. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>>.

WANG, M. Y. *et al.* SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2020. v. 10, n. November, p. 1–17.

WANG, Shuang *et al.* Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. **International Immunopharmacology**, 2015. v. 27, n. 1, p. 38–45. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.035>>.

WANG, Wenshi *et al.* Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections. **Science Signaling**, 25 abr. 2017. v. 10, n. 476, p. eaah4248. Disponível em: <<https://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.aah4248>>.

WAUTERS, E. *et al.* Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. **Cell Research**, 2021. v. 31, n. 3, p. 272–290.

WEI, L. *et al.* Viral Invasion and Type I Interferon Response Characterize the Immunophenotypes During Covid-19 Infection. **SSRN Electronic Journal**, 2020. v. 7, n. 3, p. 285–292. Disponível em: <<https://www.ssrn.com/abstract=3564998>>.

WILSON, M. S. *et al.* Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. **Journal of Experimental Medicine**, 15 mar. 2010. v. 207, n. 3, p. 535–552. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/207/3/535/40505/Bleomycin-and-IL1beta-mediated-pulmonary-fibrosis-is>>.

WOLKEWITZ, M.; PULJAK, L. Methodological challenges of analysing COVID-19 data during the pandemic. **BMC Medical Research Methodology**, 14 dez. 2020. v. 20, n. 1, p. 81. Disponível em: <<https://bmcmmedresmethodol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12874-020-00972-6>>.

WU, Chaomin *et al.* Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress

Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, 2020. p. 1–10.

WU, Congqing *et al.* Inflammasome Activation Triggers Blood Clotting and Host Death through Pyroptosis. **Immunity**, 2019. v. 50, n. 6, p. 1401- 1411.e4. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.003>>.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, 7 abr. 2020. v. 323, n. 13, p. 1239. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130>>.

XIONG, Y. *et al.* Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging Microbes & Infections**, 1 jan. 2020. v. 9, n. 1, p. 761–770. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1747363>>.

XU, X. *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. **Veterinary Microbiology**, 2013. v. 164, n. 3–4, p. 212–221. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.034>>.

XU, X. G. *et al.* Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells. **Acta Virologica**, 2015. v. 59, n. 3, p. 265–275.

XU, Y. *et al.* New Computational Tool Based on Machine-learning Algorithms for the Identification of Rhinovirus Infection-Related Genes. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, 16 jan. 2020. v. 22, n. 10, p. 665–674. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/177063/article>>.

XU, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, abr. 2020. v. 8, n. 4, p. 420–422. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)>.

YANG, W. *et al.* NLRP3 inflammasome is essential for the development of chronic obstructive pulmonary disease. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, 2015. v. 8, n. 10, p. 13209–13216.

YANG, X. *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet Respiratory Medicine**, 2020. v. 8, n. 5, p. 475–481. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)>.

YAP, J. K. Y.; MORIYAMA, M.; IWASAKI, A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. **The Journal of Immunology**, 2020. v. 205, n. 2, p. 307–312.

ZHANG, Qian *et al.* Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, 23 out. 2020. v. 370, n. 6515, p. eabd4570. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abd4570>>.

ZIEGLER, C. G. K. *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, maio. 2020. v. 181, n. 5, p. 1016- 1035.e19. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420305006>>.