

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGÊNICOS

LUANA ALEXANDRINA AMARAL

**Avaliação da ativação dos inflamassomas em autópsias de
pacientes com COVID-19**

Ribeirão Preto

2021

LUANA ALEXANDRINA AMARAL

Avaliação da ativação dos inflamassomas em autópsias de pacientes com COVID-19

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biomédicas com ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Co-Orientadora: Keyla Santos Guedes de Sá

Ribeirão Preto

2021

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais e familiares por todo o apoio e investimento em minha educação e crescimento pessoal, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço também aos professores de graduação com os quais tive contato, por todo o conhecimento compartilhado e disponibilidade para conversas esclarecedoras.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dario Simões Zamboni por acreditar em minha capacidade e me apoiar durante a execução de diferentes projetos de pesquisas ao longo dos 3 anos de Iniciação Científica.

À minha co-orientadora, Keyla Guedes Santos de Sá por todos os ensinamentos, e pelo acolhimento e paciência durante meu crescimento pessoal e científico em todo o período de Iniciação Científica.

Aos colegas do Laboratório de Imunidade Inata e Patogênese Microbiana pelos ensinamentos e auxílio.

Aos meus amigos e colegas de turma, os quais foram essenciais durante os anos de graduação.

Aos professores e colegas do Studio de Dança Luciana Junqueira os quais foram muito importantes para minha adaptação à cidade, mas também me proporcionaram diversos novos conhecimentos na atividade que mais amo: dançar

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento para a execução desse projeto.

Por último, agradeço a mim mesma pela perseverança e proatividade durante os anos de graduação e frente aos diferentes projetos desenvolvidos sob orientação do Prof. Dr. Dario Simões Zamboni e Keyla Guedes Santos de Sá.

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte. A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 57^a Sessão Ordinária, realizada em 04/10/2021.

Sumário

Agradecimentos	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	8
Resumo	9
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. SARS-CoV-2.....	11
1.2. Coronavírus e SARS-CoV-2	12
1.3. Sistema respiratório e parâmetros respiratórios.....	14
1.4. SARS-CoV-2 e tropismo celular.....	15
1.5. Imunidade Inata e Inflamassoma de NLRP3.....	17
1.6. SARS-CoV-2 e ativação do inflamassoma de NLRP3.....	19
2. Objetivo	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3. Material e Métodos	24
3.1. Pacientes.....	24
3.2. Imunohistoquímica (IHQ)	24
3.3. Imunofluorescência.....	25
3.4. Análise Estatística.....	25
4. Resultados.....	26
4.1. Caracterização dos grupos	26
4.2. Componentes do inflamassoma são mais expressos em amostras teciduais de pacientes com COVID-19.....	28
4.3. O parênquima pulmonar de pacientes com COVID-19 apresenta maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3.....	31
4.4. Pacientes com COVID-19 apresentam puncta de ASC e NLRP3 em macrófagos, células endoteliais e células ciliadas	33
4.5. Ativação do inflamassoma ocorre em diversos órgãos de pacientes com COVID-19	35
4.6. A ativação do inflamassoma correlaciona positivamente com o tempo de internação do paciente e com a piora na função pulmonar.....	37
5. Discussão	40
6. Conclusões	46
7. Referências Bibliográficas.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2	13
Figura 2: Inflamassoma de ASC e NLRP3	18
Figura 3: O parênquima pulmonar de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresenta expressão do inflamassoma de NLRP3	29
Figura 4: O parênquima pulmonar de pacientes diagnosticados com COVID-19 possui maior expressão dos componentes do inflamassoma	30
Figura 5: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam maior ativação do inflamassoma	33
Figura 6: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em macrófagos, células endoteliais e células ciliadas.....	34
Figura 7: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam expressão de componentes e ativação do inflamassoma de NLRP3 em tecido adiposo, baço, fígado e rins.....	36
Figura 8: Em casos letais de COVID-19, a ativação do inflamassoma correlaciona-se ao tempo de sobrevida de pacientes diagnosticados com COVID-19.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

- AaDO₂: Diferença de PO₂ alveolar-arterial
AIM2: *Absent in melanoma 2*
ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2
ALI: Lesão pulmonar aguda
ALT: Alanina aminotransferase
ARDS: Síndrome de insuficiência respiratória aguda
ASC: Proteína speck-like associada à apoptose com domínio CARD
AST: Aspartato aminotransferase
COVID-19: Doença do coronavírus 2019
DAD: Dano alveolar difuso
DAMPS: Padrões moleculares associados ao dano
DMVs: Vesículas de dupla membrana induzidas por vírus
FiO₂: Fração inspirada de oxigênio
GSDMD: Gasdermina D
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-6: Interleucina 6
IL-18: Interleucina 18
LDH: Enzima lactato desidrogenase
MERS: Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS-CoV: Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NAAT: Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos
NLRP3: *NLR family pyrin domain containing 3 protein*
NLRs: Receptor do tipo NOD
Nsp: Proteínas não estruturais
OMS: Organização mundial da saúde
ORF: Open Reading Frames (fases de leitura aberta)
PAMPS: Padrões moleculares associados a patógenos
P_AO₂: Pressão parcial de oxigênio alveolar
P_aO₂: Pressão parcial de oxigênio arterial
PCR: Proteína C reativa
Qs/Qt: Fração de shunt
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SARS: Síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV2: Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SIMPLE: Sequencial immunoperoxidase Labeling and Erasing
S_vO₂: Saturação venosa mista de oxigênio
TLR: Receptores toll-like
TMPRSS2: Serina protease transmembrana 2
TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa
TP: Tempo de Protrombina

Resumo

Introdução: Um estudo realizado no nosso laboratório demonstrou que pacientes com COVID-19 apresentam ativação do inflamassoma de NLRP3, o que está associado com quadros graves da doença. Entretanto não se sabe em quais células esse inflamassoma está ativo e como ele pode estar contribuindo para a patogênese da doença. **Material e Métodos:** Avaliamos a expressão e ativação do inflamassoma em autópsias de pacientes que faleceram por COVID-19, influenza e adenocarcinoma por meio de técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência. **Resultados:** Observamos que na infecção por SARS-CoV-2 há uma maior expressão dos componentes do inflamassoma no parênquima pulmonar quando comparado com amostras de pacientes diagnosticados com influenza e adenocarcinoma. Além da expressão dos componentes, verificamos uma maior ativação do inflamassoma (observada por meio da contagem de puncta de NLRP3) em células endoteliais, células ciliadas, macrófagos, tecido adiposo, baço, fígado e rins destes pacientes. Ademais, observamos que a ativação do inflamassoma relaciona-se à piora da função pulmonar frente a infecção por SARS-CoV-2. **Conclusão:** Evidenciamos que o parênquima pulmonar de pacientes que faleceram por infecção com SARS-CoV-2 apresenta maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 quando comparado com o parênquima pulmonar de pacientes com Influenza ou pacientes diagnosticados adenocarcinoma. Ademais, a ativação do inflamassoma ocorre em diferentes tecidos e células como macrófagos, células endoteliais, células ciliadas, baço, rins, fígado e tecido adiposo. Por fim, observamos que a ativação do inflamassoma relaciona-se à piora da função pulmonar destes pacientes.

Abstract

Introduction: A study realized in our laboratory showed that patients with COVID-19 have NLRP3 inflammasome activation, which is associated with severe disease. However, it is not known in which cells this inflammasome is active and how it may be contributing to the pathogenesis of the disease. **Material and Methods:** We evaluated the inflammasome expression and activation in autopsies of patients who died from COVID-19, influenza and adenocarcinoma through immunohistochemistry and immunofluorescence techniques. **Results:** We observed in SARS-CoV-2 infection a greater expression of inflammasome components in lung parenchyma when compared to patients diagnosed with influenza and adenocarcinoma. In addition to the expression of the components, there is also activation of inflammasome (observed by counting NLRP3 puncta) in the endothelial cells, ciliated cells, macrophages, adipose tissues, spleen, liver and kidney of these patients. Furthermore, we observed that inflammasome activation is related to the worsening of lung function during SARS-CoV2 infection. **Conclusion:** We evidenced that lung parenchyma of patients who died from SARS-CoV-2 infection has greater activation of the ASC and NLRP3 inflammasome when compared to lung parenchyma of patients infected with influenza or patients diagnosed with adenocarcinoma. Moreover, inflammasome activation occurs in different tissues and cells such as macrophages, endothelial cells, ciliated cells, spleen, kidneys, liver and adipose tissue. Finally, we observed that inflammasome activation is related to the worsening of pulmonary function in these patients.

1. Introdução

1.1. SARS-CoV-2

A infecção pelo vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) ocasiona casos leves a graves de Síndrome Respiratória, a qual possui mais de 255.000.000 casos confirmados e 5.127.000 mortes até o momento (WHO, 2021). Os primeiros casos da doença foram reportados em dezembro de 2019 na cidade chinesa Wuhan quando diferentes pacientes foram diagnosticados com pneumonia após contato direto com um mercado de frutos do mar (Zhu *et al.*, 2020). Rapidamente a doença disseminou-se mundialmente, sendo o primeiro caso de infecção no Brasil reportado em fevereiro de 2020 na cidade de São Paulo e a pandemia declarada pela OMS em março de 2020 (Ministério da saúde, 2020; WHO, 2020).

Dentre os sintomas da doença estão febre, tosse, náusea, dor de cabeça e fadiga, os quais podem surgir entre 2 a 14 dias após o contato com o vírus (CDC, 2021). Já a transmissão viral ocorre via hospedeiro infectado por meio de partículas virais transmissíveis pelo ar, fala, tosse, espirros e contato direto entre superfícies contaminadas com mucosas como nariz, olhos e boca (WHO, 2020).

O diagnóstico viral por sua vez inclui os Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT) e os testes de antígenos virais (CDC, 2021). NAAT são testes sensíveis à carga viral de SARS-CoV-2 os quais por meio da detecção de ácidos ribonucleicos (RNA) virais oriundos de amostras das vias respiratórias de pacientes infectados são capazes de fornecer resultados qualitativos e/ou quantitativos da infecção (CDC, 2021). Em contrapartida, os testes de antígenos virais são imunoensaios para detecção de proteínas virais específicas, entretanto tais testes são menos sensíveis em certas condições e podem necessitar confirmação por NAATs (WHO, 2021). Ademais, testes sorológicos são sensíveis a anticorpos criados após contato com o vírus, e são comumente utilizados para detectar infecções prévias (FDA, 2021).

1.2. Coronavírus e SARS-CoV-2

Os Coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, e são divididos entre os gêneros *alfacoronavírus*, *betacoronavírus*, *gamacoronavírus* e *deltacoronavírus*, pertencentes à subfamília *Coronavirinae* (ICTV,2009). Tais vírus possuem genoma não segmentado e são vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva, os quais possuem espículas grandes e espaçadas em seu envelope (ICTV,2009). Dentre as proteínas estruturais principais dos coronavírus estão a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína de transmembrana (M), a proteína do envelope (E), a glicoproteína HE, e a glicoproteína Spike (S; Holmes KV, 1999).

Os coronavírus possuem diferentes hospedeiros como roedores, aves, morcegos e humanos; além disso tais vírus estão relacionados a infecções das vias respiratórias e trato gastrointestinal e a síndromes amplamente conhecidas como a Síndrome respiratória aguda grave (SARS) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) (Holmes KV, 1999, ICTV,2009, WHO,2021). Ambos os vírus SARS-CoV e MERS-CoV possuem os morcegos como principal reservatório viral, e mamíferos como dromedários e *palm civets* representam hospedeiros intermediários para a disseminação em humanos (Li *et al.*, 2005; Ithete *et al.*, 2013; WHO,2021).

O vírus SARS-CoV-2, assim como o vírus SARS-CoV, pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *betacoronavírus* (ICTV, 2020). Análises filogenéticas evidenciam que o vírus SARS-CoV-2 possui 79% de sua sequência genética similar ao vírus SARS-CoV. (Lu, R., Zhao, 2020). Além disso, ambos possuem o morcego como reservatório viral e compartilham a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) como um cofator de entrada viral e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor, a qual por sua vez reconhece a proteína S iniciando o processo de internalização viral (Hoffmann *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020).

O vírus SARS-CoV-2 possui fases de leitura aberta (ORF) as quais após a liberação do material genético viral no citoplasma da célula hospedeira, são traduzidas em diferentes componentes como a RNA polimerase viral (Wu and Mcgoogan, 2020; Figura 1). Há então a transcrição e tradução das proteínas virais como E, M, N e S e replicação viral em vesículas de dupla membrana induzidas por vírus (DMVs) e posteriormente inserção dos componentes virais ao compartimento

intermediário do Complexo de Golgi onde os nucleocapsídeos compostos pela proteína N aderem aos componentes do envelope para formar virions (Stertz *et al.*, 2007). Por fim, os virions maduros são transportados por meio de vesículas até a membrana celular onde são liberados por brotamento (De Haan and Rottier, 2005; Figura 1).

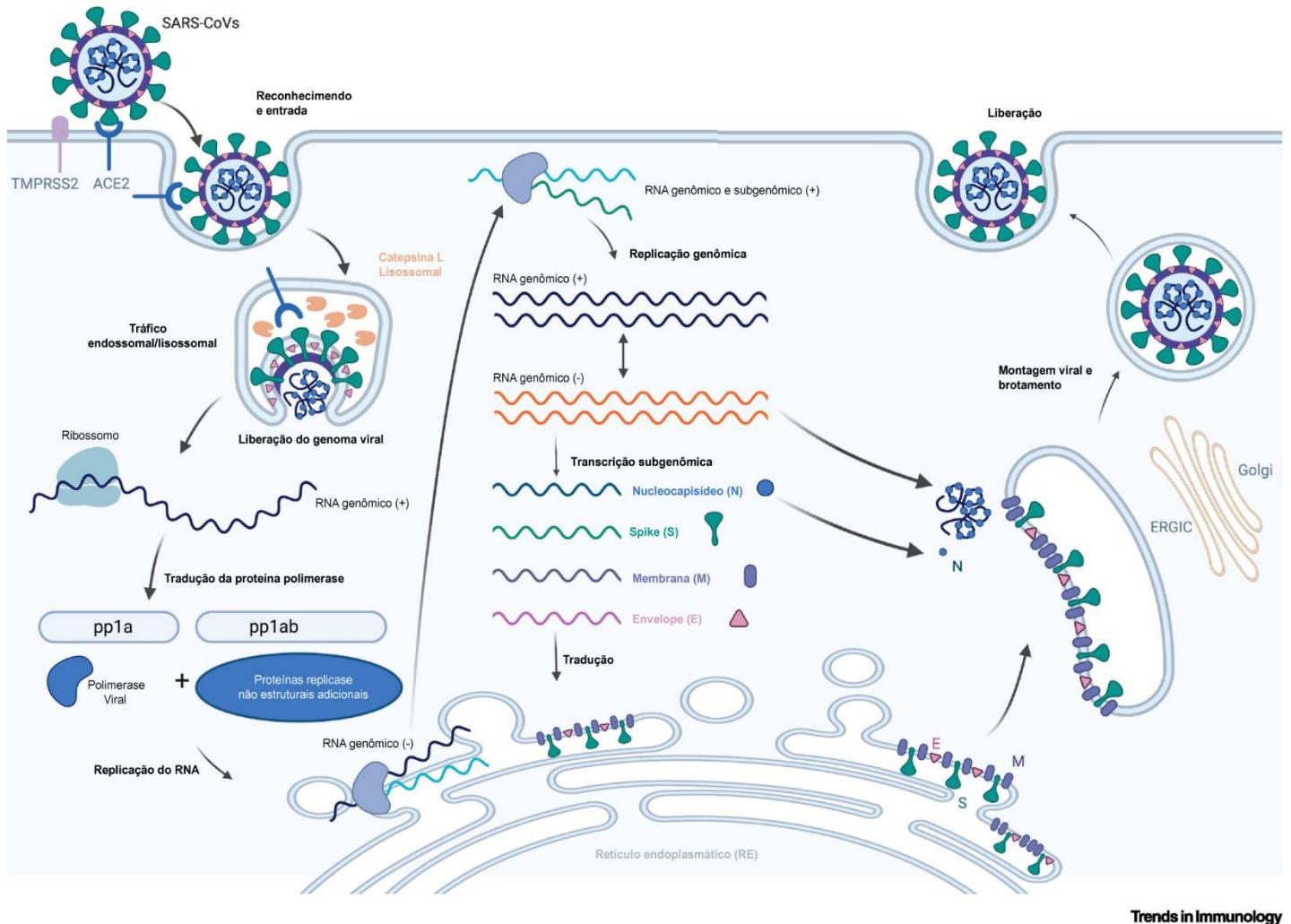


Figura 1: Ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2 (Fonte: Harrison, *et al.*, 2020, modificado).

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2 acomete principalmente os pulmões, ocasionando o recrutamento de diferentes células imunes (Chen *et al.*, 2021). As citocinas liberadas podem controlar a infecção ou gerar uma resposta imune exacerbada, conhecida como Tempestade de Citocinas, que está relacionada com a

Síndrome de Insuficiência Respiratória Aguda (ARDS), uma das principais causas de morte em pacientes infectados. (Huang *et al.*, 2020).

1.3. Sistema respiratório e parâmetros respiratórios

O sistema respiratório possui diversas funcionalidades como trocas gasosas entre O₂ e CO₂, equilíbrio térmico, fonação e defesa contra agentes agressores (AIRES, Margarida., 2012). Tal sistema é dividido em vias aéreas superiores compreendidas por nariz, seios nasais e laringe; e vias aéreas inferiores: traqueia, brônquios, bronquíolos, ductos alveolares e alvéolos (KOEPPEN, B.M. e STANTON, B.A., 2009).

O muco recobre as vias condutoras e constitui um dos componentes de limpeza mucociliar responsável por remover impurezas, partículas bacterianas e virais (Bustamante-Marin, *et al.*, 2017). O sistema mucociliar é composto por células caliciformes produtoras de muco e células ciliadas, as quais transportam o muco por meio dos batimentos dos seus cílios (Reid LM e Jones R, 1980). Frente a estressores como infecções virais, a produção de muco é aumentada e as células ciliadas podem ser comprometidas ocasionando perda da movimentação do muco e consequente alteração desta função protetora (Sims *et al.*, 2005). Análises de amostras pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam aumento da secreção mucosa, assim como exudação fibrinosa, o que por sua vez pode agravar a disfunção ventilatória nesta doença (Wang *et al.*, 2020).

Outro tipo celular essencial para a proteção do trato respiratório são os macrófagos, células responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, assim como a destruição de microrganismos e tecidos danificados. Além disso, devido ao grande número de vasos existentes, as células endoteliais também são de suma importância para a homeostasia do sistema. Frente a desregulações, tais células possuem papel na vasoconstrição, inflamação e desregulação da resposta imune anti viral (Bernard, I. *et al.*, 2020).

Diversos parâmetros são utilizados para monitorar a respiração humana. A frequência respiratória, por exemplo, equivale ao número de ciclos respiratórios executados em um período de tempo. A pressão parcial de oxigênio alveolar (P_AO₂)

representa o fornecimento de oxigênio aos alvéolos enquanto que a pressão parcial de oxigênio arterial (P_{aO_2}) reflete o fornecimento de oxigênio ao sangue arterial (AIRES, Margarida., 2012). A P_{aO_2} é negativamente proporcional à idade sendo representada pela equação: $P_{aO_2} = 103,5 - 0,42 \times \text{idade}$, ou seja, indivíduos idosos possuem uma menor P_{aO_2} (Sorbin *et al.*, 1968). Outra medida respiratória é a fração inspirada de oxigênio (FiO_2) a qual constitui o índice de oxigenação por meio da relação P_{aO_2}/FiO_2 , valores abaixo de 300mmHg indicam lesão pulmonar aguda (ALI), e valores abaixo de 200mmHg indicam Síndrome de Insuficiência Respiratória Aguda (ARDS; Bernard *et al.*, 1994). Já a diferença entre o oxigênio alveolar e o oxigênio arterial denomina-se diferença de PO_2 alveolar-arterial ($AaDO_2$), valores normais encontram-se a baixo de 25mmHg e o aumento desta medida indica troca gasosa anormal (KOEPPEN, B.M. e STANTON, B.A., 2009). A saturação venosa mista de oxigênio (SvO_2) por sua vez caracteriza a oxigenação tecidual, seu valor usual está entre 60-80% (LHSC, 2018).

Outro parâmetro respiratório é fração de shunt (Qs/Qt), a qual reflete a competência da oxigenação pulmonar (Suter *et al.*, 1975). A fração de Shunt é a porcentagem sanguínea que atinge o leito arterial sistêmico sem apresentar oxigenação, grandes porcentagens de shunt relacionam-se a problemas de troca gasosa (Peyton *et al.*, 2004).

1.4. SARS-CoV-2 e tropismo celular

O recrutamento de células imunes e a liberação exacerbada de citocinas gera dano da infraestrutura pulmonar, o que foi evidenciado em amostras de pacientes que faleceram por COVID-19 (Kommooss *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Dentre as consequências da infecção estão dano do epitélio e endotélio pulmonar, assim como dano alveolar difuso, alterações no processo de reparo do tecido e morte celular proeminente (D'agnillo *et al.*, 2021).

O vírus SARS-CoV-2 replica-se no trato respiratório superior e trato respiratório inferior, fato esse que pode explicar a alta transmissão do vírus SARS-CoV-2 quando comparado com os vírus SARS-CoV e Mers-Cov (Hou YJ, Okuda K, 2020). Além disso, a infecção de pulmões ex vivo com SARS-CoV-2 apresenta menores títulos virais quando comparado com infecção pelo vírus Influenza nos tempos de 24 horas

e 48 horas pós infecção (Hui *et al.*, 2020). Tal dado pode justificar a dificuldade de identificar a infecção viral nos primeiros dias, o que corrobora com a dificuldade de controlar a disseminação viral.

A proteína Spike (S), a qual é reconhecida pelo receptor ACE2, é um dos elementos determinadores da virulência, hospedeiros e tropismo a diferentes tecidos (Ou *et al.*, 2020). Estudos evidenciaram que o receptor ACE2 é expresso em células de diferentes órgãos como o trato intestinal, coração, rins, pâncreas e fígado (Ziegler *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2020; Gaussen *et al.*, 2021). Além disso, demonstrou-se também a infecção por SARS-CoV-2 em órgãos como rins, pâncreas e coração (Liu *et al.*, 2021). Uma vez que diferentes órgãos são infectados por SARS-CoV-2, é de suma importância entender a relevância da resposta imune desencadeada em diferentes tecidos e sua relevância no quadro altamente pró-inflamatório característico da COVID-19.

Além disso, evidenciou-se a infecção *ex vivo* de SARS-CoV-2 em diferentes células da via respiratória como células epiteliais alveolares, células caliciformes e células ciliadas (Hui *et al.*, 2020). As células ciliadas fazem parte das regiões traqueobrônquicas das vias aéreas e também são susceptíveis à infecção do vírus SARS-CoV apresentando alterações morfológicas que podem correlacionar-se com consequências patológicas (Sims *et al.*, 2005). Recentemente foi descrito que tais células são infectadas por SARS-CoV-2, e apresentam alterações nos cílios que prejudicam a movimentação do muco, um importante componente da defesa do trato respiratório. (Robinot *et al.*, 2021) Além disso, análises de expressão utilizando amostras de pacientes infectados por SARS-CoV-2 demonstraram que células ciliadas apresentam maior expressão de ACE2 e TMPRSS2, o que indica maior tropismo do vírus SARS-CoV-2 por tais células (Chen *et al.*, 2021). Estes dados evidenciam a importância de elucidar os mecanismos e as consequências da infecção de diferentes tipos celulares da via respiratória pelo vírus SARS-CoV-2.

Frente a infecções virais, a liberação de partículas virais por células infectadas ocasiona a morte celular da célula hospedeira, liberando padrões moleculares associados ao dano (DAMPS) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS). Tais padrões são reconhecidos por células do sistema imune inato como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos ocasionando a liberação de citocinas

pró-inflamatórias e quimiocinas, as quais por sua vez atraem outras células imunes estabelecendo um perfil pró-inflamatório.

Autópsias de pacientes que faleceram devido à infecção por SARS-CoV-2 apresentam alta quantificação de células dendríticas, macrófagos, células NK, fibroblastos e células endoteliais nos pulmões. (Delorey *et al.*, 2021). Ademais, demonstrou-se que macrófagos infectados por SARS-CoV-2 apresentam aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α além de apresentarem maior expressão de componentes da resposta imune inata como o receptor intracitoplasmático NLRP3 e IL-1 β (Abdelmoaty *et al.*, 2021). Recentemente foi descrito que o inflamassoma de NLRP3, um importante mecanismo efetor da resposta imune inata, é ativado em resposta ao vírus SARS-CoV-2 (Rodrigues *et al.*, 2021). A ativação deste complexo imune pode relacionar-se ao controle da infecção, ou à inflamação exacerbada característica da COVID-19.

1.5. *Imunidade Inata e Inflamassoma de NLRP3*

Os receptores da família dos Nod-like receptors (NLRs) são moléculas de reconhecimento de padrões moleculares do sistema imune inato, e se localizam no citosol de diferentes tipos celulares como células epiteliais e fagócitos. NLRs podem reconhecer diferentes tipos de PAMPs e DAMPs e recrutar moléculas para a formação de complexos imunes denominados inflamassomas.

Inflamassomas são complexos multiproteicos formados por um componente sensor, como receptores do tipo NOD (NLRs) ou sensores de DNA citosólico (AIM2), um componente adaptador denominado proteína speck-like associada à apoptose com domínio CARD (ASC) e uma caspase inflamatória (Broz and Dixit, 2016) (Figura 2). Frente ao reconhecimento de DAMPs ou PAMPs o componente sensor é ativo e associa-se com a proteína ASC, a qual por sua vez recruta e ativa uma caspase inflamatória, formando uma estrutura denominada *speck* ou *puncta* (LATZ E, 2013). Após o recrutamento da caspase, a mesma é clivada em sua forma ativa e realiza a clivagem de diferentes componentes como pro-IL1 β em IL1 β , pro-IL18 em IL-18 e Gasdermina D (Broz and Dixit, 2016). A Gasdermina D (GSDMD) é uma proteína citosólica que quando clivada apresenta o direcionamento do seu N-terminal à membrana celular, formando poros na membrana. (Shi *et al.*, 2015). Tais poros

permitem a secreção de componentes intracelulares, secreção de IL- β , IL-18 e em um estágio final ocasiona a morte celular inflamatória denominada piroptose. (Rühl and Broz, 2016).

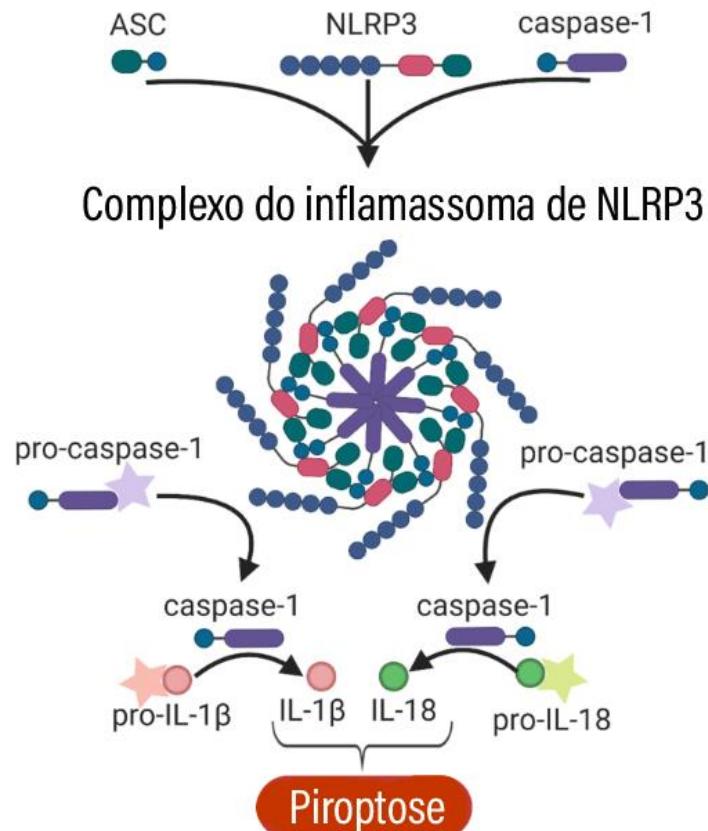


Figura 2: Inflamassoma de ASC e NLRP3 (Fonte: O'Brien, et al., 2020 modificado)

O inflamassoma de NLRP3 necessita de dois sinais para sua ativação. O primeiro sinal denominado *priming* é o reconhecimento de componentes extracelulares por receptores como receptores toll-like (TLRs), resultando em ativação do fator de transcrição NF-KB o qual por sua vez aumenta a expressão de NLRP3 e pro-IL-1 β (Kelley et al., 2019). Já o segundo sinal pode ser caracterizado por diferentes estímulos como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial, mudanças nas concentrações intracelulares de cálcio e efluxo de potássio (Rühl and Broz, 2016).

Entretanto, a ativação do inflamassoma de NLRP3 pode controlar infecções ou ocasionar inflamação exacerbada, devido à alta liberação de componentes pró inflamatórios como IL-1 β . Sua ativação exacerbada e consequente liberação de fatores pro-inflamatórios pode contribuir para a progressão de diversas doenças como diabetes do tipo 2, doença de Alzheimer, obesidade, fibrose hepática e a COVID-19 (Fusco *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2021).

Já o inflamassoma de AIM2 (*Absent in melanoma 2*) reconhece DNA de dupla fita citosólico, possui como componentes adaptador a proteína ASC e a caspase 1 como caspase inflamatória (Hornung *et al.*, 2009). Assim como o inflamassoma de NLRP3, sua ativação gera a clivagem e secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 β e IL-18. Além disso, o inflamassoma de AIM2 possui papel protetor em infecções por bactérias e vírus de DNA (Rathinam *et al.*, 2010). Contudo, também possui papel deletério em doenças como psoríase, onde contribui para a perpetuação da inflamação por meio da liberação de IL-1 β (Dombrowski *et al.*, 2011).

1.6. SARS-CoV-2 e ativação do inflamassoma de NLRP3

O vírus SARS-CoV-2 possui maior potencial infectivo em células alveolares epiteliais, o que é associado ao dano tecidual ocasionado no pulmão frente à alta liberação de mediadores pro-inflamatórios (Rendeiro *et al.*, 2021). A ativação do inflamassoma de NLRP3 por sua vez foi descrita na infecção por Influenza, e SARS-CoV-2 (Ichinohe *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2021). Em infecções virais respiratórias como Influenza foram detectados altos níveis de IL-1 β em fluidos brônquio alveolares e plasma de pacientes infectados (Freeman and Swartz, 2020). O mesmo é observado em resposta à infecção por SARS-CoV-2: mediadores pró-inflamatórios correlacionados com a ativação do inflamassoma, como IL-1 β e IL-18 possuem quantificação sanguínea elevada (Satis H, 2021; Huang C, Wang Y, 2020).

Além disso, sabe-se que proteína N, componente do vírus SARS-CoV-2 necessária para a replicação e montagem viral, é capaz de ativar o inflamassoma de NLRP3 e associa-se ao dano pulmonar ocasionado pela ativação do inflamassoma (Cong *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2021). Ademais, a ativação do inflamassoma foi descrita em monócitos do sangue periférico de pacientes diagnosticados com COVID-19, e

relaciona-se à severidade da doença, o que indica possíveis consequências sistêmicas da liberação de citocinas frente a ativação do inflamassoma (Rodrigues et al., 2021). Foi observado também que pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam níveis séricos elevados da enzima lactato desidrogenase (LDH), um marcador de morte celular por lise de membrana o qual pode relacionar-se à ativação do inflamassoma e piroptose (Liu et al., 2020).

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ativação do inflamassoma em autópsias de pacientes com COVID-19, influenza e adenocarcinoma pulmonar (área benigna) disponíveis e armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

2.2. Objetivos Específicos

I) Avaliar a expressão de componentes do inflamassoma e ativação do inflamassoma em autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19, Influenza e adenocarcinoma

Racional: Ocorre ativação do inflamassoma de NLRP3 amostras de pacientes diagnosticados com COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021). Entretanto, pouco se sabe sobre a participação do inflamassoma na patogênese desta infecção. Dessa forma, nosso objetivo foi avaliar a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em amostras pulmonares de pacientes com COVID-19, influenza e adenocarcinoma.

Metodologia: Para avaliar a expressão dos componentes do inflamassoma de ASC e NLRP3 no tecido pulmonar, foram utilizadas 64 amostras teciduais de autópsia de pacientes diagnosticados com COVID-19, influenza ou adenocarcinoma armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras foram marcadas por imunofluorescência e imunohistoquímica para SARS-CoV-2, ASC, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β e foram analisadas por microscopia.

II) Avaliar quais células possuem inflamassoma ativo nas autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19

Racional: Uma vez que o inflamassoma de ASC e NLRP3 está presente em amostra de pacientes infectados por SARS-CoV-2, foi de nosso interesse investigar quais tipos

celulares do parênquima pulmonar possuem expressão e ativação dos componentes do inflamassoma de ASC e NLRP3.

Metodologia: Para avaliar a expressão e ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em diferentes células, foram utilizadas amostras teciduais de autópsia de pacientes diagnosticados com COVID-19, Influenza ou adenocarcinoma armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras foram marcadas por imunofluorescência e imunohistoquímica para macrófagos (CD64) e células endoteliais (CD34) e foram analisadas por microscopia.

III) Avaliar a ativação do inflamassoma em diferentes órgãos de pacientes diagnosticados com COVID-19

Racional: Estudos evidenciaram a infecção de diferentes órgãos por SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2021). Diante desses resultados, investigamos a ocorrência de uma ativação sistêmica do inflamassoma.

Metodologia: Para avaliar a expressão e ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em diferentes órgãos, foram utilizadas amostras de baço, rins, fígado e tecido adiposo de autópsias de pacientes diagnosticados com COVID-19 armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras foram marcadas por imunofluorescência e imunohistoquímica para SARS-CoV-2, ASC, NLRP3, macrófagos, hepatócitos e foram analisadas por microscopia.

IV) Correlacionar os dados clínicos dos pacientes com SARS-CoV-2 e a ativação do inflamassoma

Racional: Já foi demonstrado que o inflamassoma é ativo frente à infecção por SARS-CoV-2 e que sua ativação se correlaciona à gravidade da doença (Rodrigues *et al.*, 2021). Dessa forma, nosso objetivo foi correlacionar os dados clínicos dos pacientes diagnosticados com COVID-19, que foram obtidos por meio dos prontuários, com as análises de ativação do inflamassoma.

Metodologia: As análises de correção foram realizadas em R (version 4.0.2) utilizando RStudio (version1.2.1056).

3. Material e Métodos

3.1. Pacientes

Foram obtidas do arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 47 amostras teciduais de autópsias minimamente invasivas de pacientes diagnosticados com COVID-19. Também foram obtidas 12 amostras teciduais de autópsias de pacientes diagnosticados com influenza e 5 amostras teciduais de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma. As amostras teciduais foram embebidas em parafina e fixadas em formalina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Foi feita a coleta e análise dos dados dos prontuários dos pacientes participantes do estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo (protocolo no. 4.089.567).

3.2. Imunohistoquímica (IHQ)

Os fragmentos de tecido em blocos de parafina foram testados por imunohistoquímica utilizando a técnica *Sequencial Immunoperoxidase Labeling and Erasing* (SIMPLE) para a avaliação de todos os marcadores no mesmo tecido. Foram utilizados anticorpos para detecção de GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , ASC e NLRP3 para a detecção dos componentes do inflamassoma. Além disso, foram utilizados anticorpos para a detecção de diferentes tipos celulares: CD68, CD34. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à biotina, e com a enzima estreptavidina conjugada à peroxidase. Por fim, as amostras teciduais foram incubadas com o cromógeno-substrato AEC peroxidase system kit (SK-4200, 346 Vector Laboratories, Burlingame, CA). Após a marcação, as lâminas foram escaneadas no microscópio de alta resolução BX61VS Olympus. Então as lamínulas foram removidas em PBS e foram desidratadas e reidratadas em um gradiente de etanol até o etanol 95% para apagar a marcação de AEC. Os anticorpos foram removidos com uma incubação de 2 minutos em solução de 0.15 mM KMnO₄/0.01M H₂SO₄, seguido imediatamente por

uma lavagem em água destilada. Os tecidos foram então marcados novamente a partir do passo de bloqueio.

3.3. *Imunofluorescência*

As lâminas foram incubadas overnight a 4ºC com anticorpos primários para detecção de GSDMD, Caspase-1, IL-1 β , ASC e NLRP3 todos componentes do inflamassoma. Além disso, foram utilizados anticorpos para a detecção de diferentes tipos celulares: macrófagos, células endoteliais e hepatócitos,. Posteriormente as amostras teciduais foram incubadas com os anticorpos secundários Goat anti-mouse Alexa fluor-647 (Invitrogen) ou goat anti-rabbit Alexa fluor-594 (Invitrogen). As imagens foram adquiridas pelo sistema Axio Observer combinado com o microscópio LSM 780 confocal device no aumento de 63x (Carl Zeiss).

3.4. *Análise Estatística*

As imagens obtidas foram analisadas por meio dos softwares Olyvia, Zen Blue e Image J. Para as contagens dos puncta, todos os cortes histológicos foram visualizados em objetiva de 63x para digitalização de imagens aleatórias utilizando o sistema LSM 780 no microscópio Axio Observer, perfazendo uma área de ~1,7 mm² de parênquima pulmonar analisado por caso. Foi realizada a contagem manual dos puncta e das células por meio das imagens adquiridas. As análises morfométricas foram realizadas de acordo com o recomendado por Weibel (1963).

Os dados foram apresentados em gráficos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad PRISM 5.0, sendo considerado significativamente estatístico p <0.05.

4. Resultados

4.1. Caracterização dos grupos

Os pacientes participantes do estudo diagnosticados com COVID-19 apresentam diferentes comorbidades: hipertensão (55,32%), diabetes melittus (38,30%), doença cardiovascular (25,53%), doença pulmonar (25,53%), doença renal (14,89%) e doença autoimune (4,26%; Tabela 1). Por meio da análise dos parâmetros respiratórios observamos que a infecção por SARS-CoV-2 ocasiona danos das funções pulmonares como comprometimento da oxigenação ($P_{a}O_2/FiO_2$), caracterizando casos de síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), além disso 76,59% dos pacientes necessitaram de ventilação mecânica. Também observamos que em média, os pacientes diagnosticados com COVID-19 participantes do estudo apresentam obesidade de grau I (IMC= 31,11).

Analizando as quantificações laboratoriais de pacientes infectados por SARS-CoV-2 evidenciamos que diversos parâmetros apresentam valores acima do usual: dímero D, creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose e lactato desidrogenase (LDH). Por fim, por meio da análise de parâmetros histológicos, observamos que os pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam em média 30% de área pulmonar com fibrose, além de 33,6% de área pulmonar com dano alveolar.

Entretanto, não foi possível realizar comparações de comorbidades, parâmetros laboratoriais, respiratórios e histológicos entre pacientes diagnosticados com COVID-19 e pacientes diagnosticados com influenza e adenocarcinoma devido a falta de informações nos registros disponíveis.

Tabela 1: Características populacionais dos pacientes recrutados para o estudo.

Características populacionais			
	COVID-19 n (% ou DP)	Influenza n (% ou DP)	Adenocarcinoma n (% ou DP)
Número de pacientes	47	12	5
Sexo feminino	23 (48,94%)	4 (33,33%)	3 (60,00%)
Sexo masculino	24 (51,06%)	8 (66,66%)	2 (40,00%)
Idade (anos)	67,98 (\pm 15,02)	41,5 (\pm 15,24)	68 (\pm 7,31)
Tempo de doença (dias)	18,09 (\pm 11,04)	-	-
Necessidade de UTI	36 (76,60%)	-	-
Comorbidades			
Hipertensão	26 (55,32%)	-	-
Índice de massa corporal	31,11 (8,82)	-	-
Diabete Mellitus	18 (38,30%)	-	-
Tabagismo	12 (25,53%)	-	-
Doença Cardiovascular	12 (25,53%)	-	-
Doença Pulmonária	12 (25,53%)	-	-
Doença Renal	7 (14,89%)	-	-
Histórico de derrame	7 (14,89%)	-	-
Doença Autoimune	2 (4,26%)	-	-
Parâmetros Laboratoriais			
PCR (mg/dL)	11,4 (\pm 8,49)	-	-
Dimero D (μ g/mL)	4,91 (\pm 4,46)	-	-
LDH (mmol/L)	5,017 (\pm 5,25)	-	-
Creatinina (mg/dL)	2,22 (\pm 1,40)	-	-
Uréia (mg/dL)	199,4 (\pm 58,48)	-	-
AST (IU/L)	201,79 (\pm 698,44)	-	-
ALT (IU/L)	124,72 (\pm 357,39)	-	-
AST/ALT	1,75 (\pm 1,6)	-	-
TP (INR)	1,82 (\pm 2,13)	-	-
Albumina (g/dL)	3,092 (\pm 0,58)	-	-
Glicemia óbito (mg/dL)	194,73 (\pm 94,60)	-	-
Parâmetros respiratórios			
Temperatura ($^{\circ}$ C)	37,39 (\pm 1,73)	-	-
Ventilação mecânica	36 (76,59%)	-	-
Canula Nasal	11 (23,40%)	-	-
Tempo de intubação (dias)	12,38 (\pm 7,15)	-	-
$P_{a}O_2$ (mmhg)	74,01 (\pm 4,64)	-	-
Saturação Venosa (S_vO_2)	67,58 (\pm 17,48)	-	-
$P_{a}O_2/FiO_2^{\#}$	159,69 (\pm 90,85)	-	-
Valor do gradiente A-a O_2 $^{\#}$	283,22 (\pm 208,31)	-	-
Frequência respiratória (mov/min)	26,55 (\pm 6,81)	-	-
Parâmetros histológicos			
Fibrose (% de área)	30 (\pm 12,68)	-	-
Dano alveolar difuso (% de area)	33,6 (\pm 17,29)	-	-
Pneumonite (% de área)	22,57 (\pm 15,35)	-	-

4.2. Componentes do inflamassoma são mais expressos em amostras teciduais de pacientes com COVID-19

Por meio da técnica Sequencial Immunoperoxidase Labeling and Erasing (SIMPE) foi evidenciado que em pacientes infectados por SARS-CoV-2 há expressão dos componentes do inflamassoma de NLRP3 no parênquima pulmonar. Além disso, as proteínas NLRP3, ASC, Caspase 1, GSDMD, IL-1 β e proteínas do vírus SARS-CoV-2 foram identificados em diferentes tipos celulares como células endoteliais (CD34+) (Figura 3 C), macrófagos pulmonares (CD68+) (Figura 3 D) e células ciliadas (Figura 3 F).

Identificamos pouca expressão dos componentes do inflamassoma de NLRP3 no parênquima pulmonar de pacientes diagnosticados com influenza quando comparado com amostras teciduais de pacientes diagnosticados com COVID-19 (Figura 3). Além disso, por meio da quantificação da área marcada por SIMPLE, observamos que autópsias de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam maior porcentagem de área marcada para os diferentes componentes do inflamassoma quando comparado com os pacientes diagnosticados com influenza e adenocarcinoma pulmonar (Figura 4).

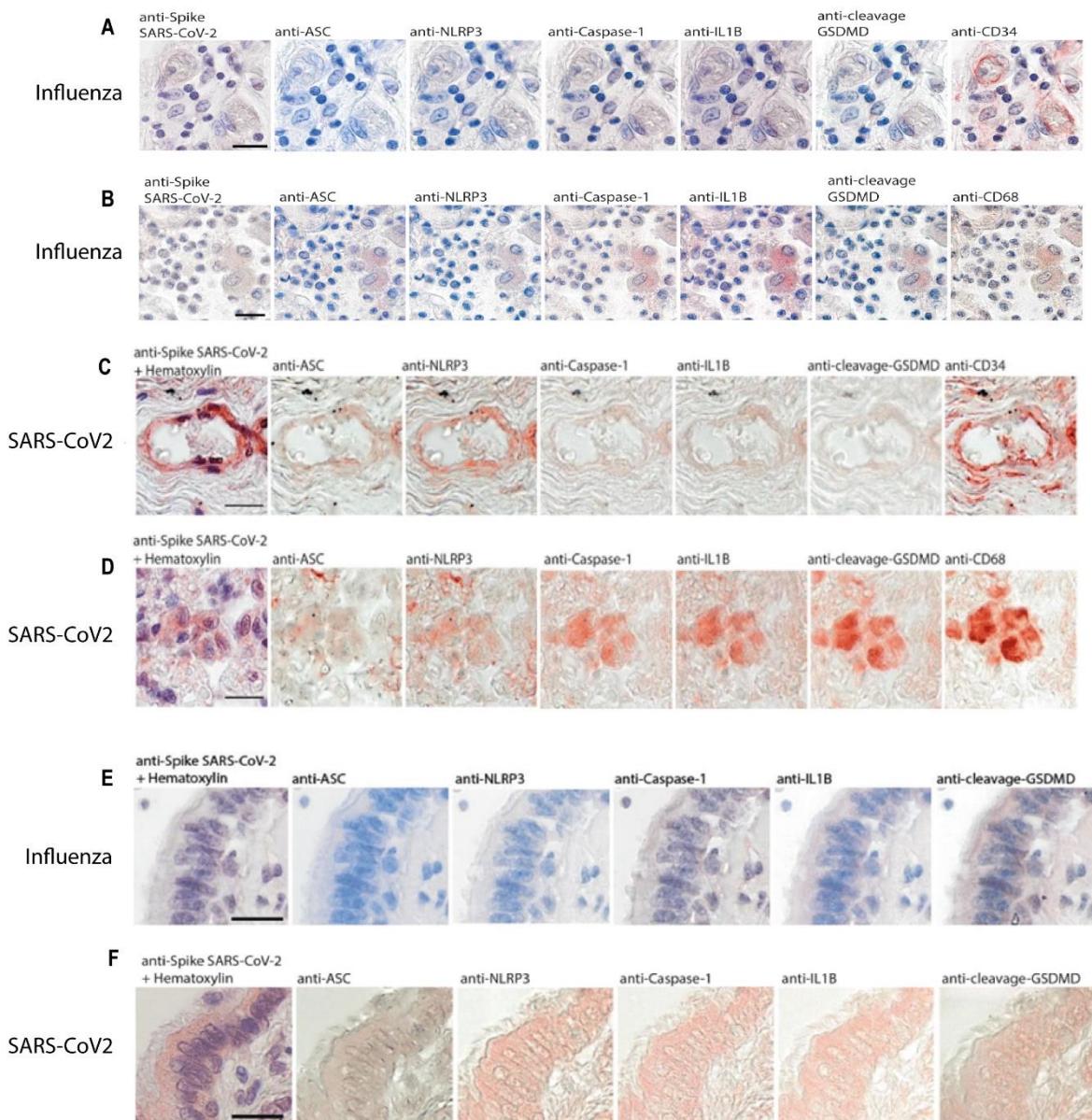


Figura 3: O parênquima pulmonar de pacientes com COVID-19 apresenta expressão de componentes do inflamassoma de NLRP3 (A, B, E) Componentes do inflamassoma foram detectados em células endoteliais, macrófagos e células ciliadas de amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com influenza. Foram utilizados anticorpos anti-NLRP3, anti-ASC, anti-IL-1 β , anti-Caspase-1, anti-GSDMD clivada e anti-CD34 por meio da técnica Sequencial immunoperoxidase Labeling and Erasing (SIMPLE). (C, D) Componentes do inflamassoma foram detectados em células endoteliais e macrófagos de amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19. (F) Componentes do inflamassoma foram minimamente detectados em células ciliadas de amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com influenza. Foram utilizados anticorpos anti-SARS-CoV-2, anti-NLRP3, anti-ASC, anti-IL-1 β , anti-Caspase-1 e anti-GSDMD clivada por meio da técnica SIMPLE. (E) Componentes do inflamassoma foram detectados em células ciliadas infectadas por SARS-CoV-2 de amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19. Foram utilizados

anticorpos anti-SARS-CoV-2 anti-NLRP3, anti-ASC, anti-IL-1 β , anti-Caspase-1, e anti-GSDMD clivada por meio da técnica SIMPLE. As imagens foram analisadas por meio dos softwares Olyvia e Image J.

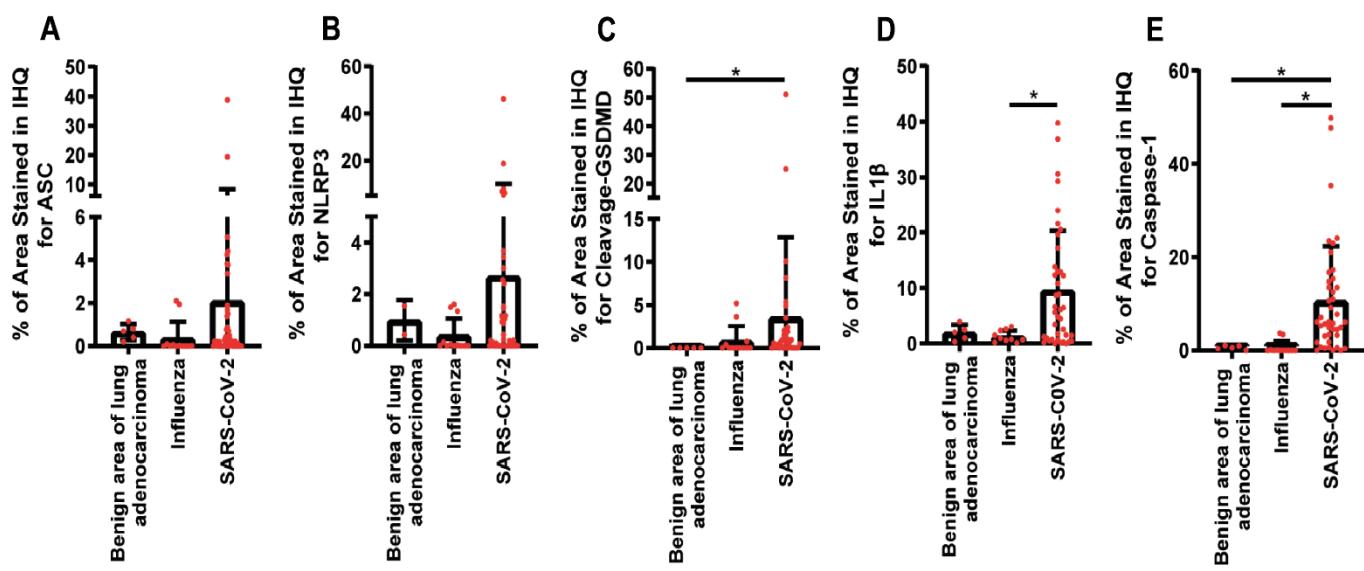


Figura 4: O parênquima pulmonar de pacientes diagnosticados com COVID-19 possui maior expressão dos componentes do inflamassoma. (A-E) Componentes do inflamassoma foram detectados em amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19, Influenza e adenocarcinoma. Foram utilizados anticorpos anti-NLRP3, anti-ASC, anti-IL-1 β , anti-Caspase-1 e anti-GSDMD clivada por meio da técnica Sequencial immunoperoxidase Labeling and Erasing (SIMPLE). A área da marcação por imunohistoquímica foi quantificada por meio dos softwares Olyvia e Image J. A figura expressa a mediana e o desvio padrão, a significância foi calculada utilizando o teste Kruskal Wallis.

4.3. *O parênquima pulmonar de pacientes com COVID-19 apresenta maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3*

Por meio da análise de amostras teciduais de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma, influenza e COVID-19 por imunofluorescência, observamos que o parênquima pulmonar de pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresenta maior ativação de NLRP3 e ASC (observado pela formação dos puncta de NLRP3 e ASC) quando comparados com influenza e adenocarcinoma (Figura 5). Tais dados evidenciam a ativação do inflamassoma frente à infecção por SARS-CoV-2, por ser maior que a observada nos pacientes influenza, sugere que esta seja uma diferença crucial entre os pacientes que pode explicar as diferenças clínicas observadas nesses dois grupos.

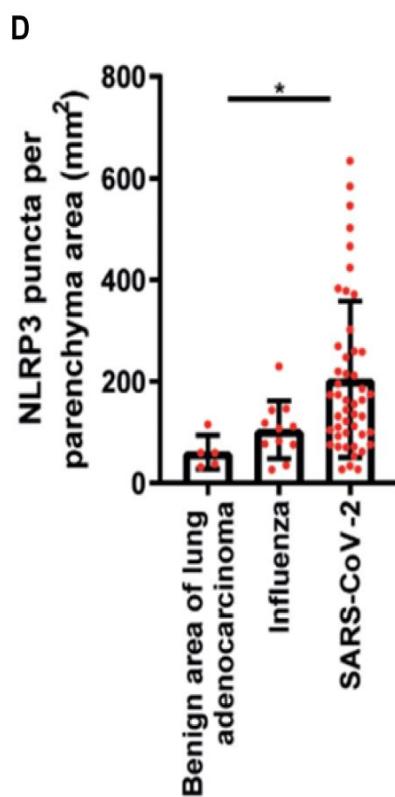
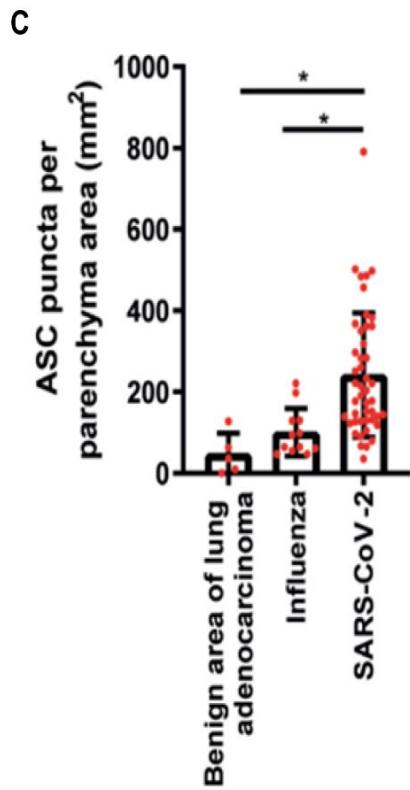
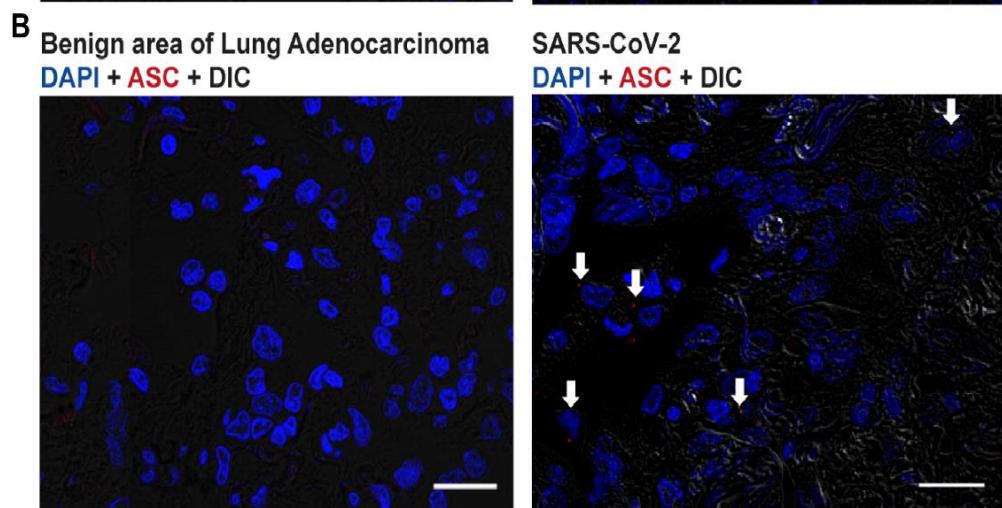
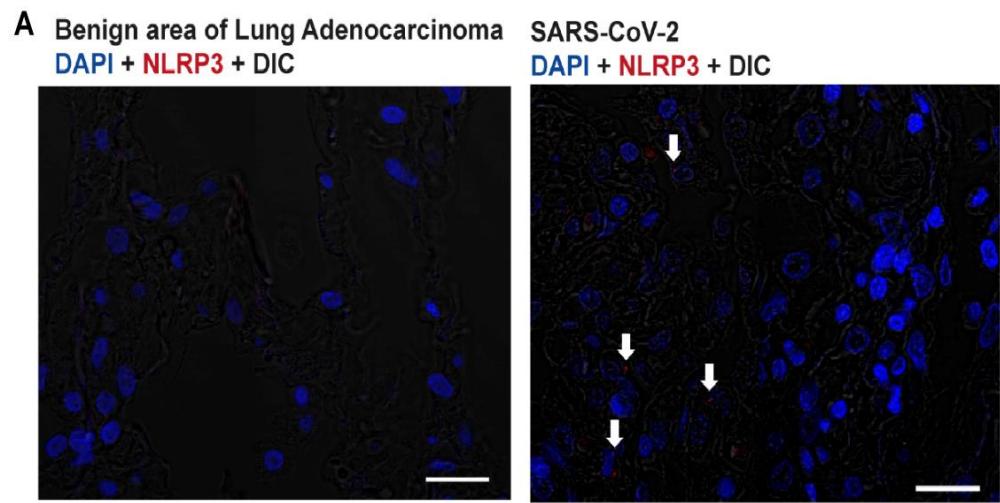


Figura 5: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam maior ativação do inflamassoma. (A,B) A ativação do inflamassoma de NLRP3 e ASC foi detectada por meio de Imunofluorescência utilizando os anticorpos anti-NLRP3 e anti-ASC em amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19 e adenocarcinoma. O núcleo celular foi detectado por DAPI. As imagens foram analisadas por meio do software Zen Blue. (C,D) A ativação do inflamassoma de NLRP3 e ASC foi detectada por meio de Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-NLRP3 e anti-ASC em amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19, Influenza e Adenocarcinoma. Os puncta de ASC e NLRP3 foram quantificados por meio da análise das imagens pelo software Zen Blue e a quantificação foi normalizada por mm^2 de área de parênquima pulmonar. A figura expressa a mediana e o desvio padrão, a significância foi calculada utilizando o teste Kruskal Wallis.

4.4. *Pacientes com COVID-19 apresentam puncta de ASC e NLRP3 em macrófagos, células endoteliais e células ciliadas*

O parênquima pulmonar possui diferentes tipos celulares os quais são importantes para a homeostasia do tecido. Sendo assim, investigamos a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3, assim como a quantificação de diferentes tipos celulares, a fim de avaliar as consequências da infecção por SARS-CoV-2.

Por meio da análise de amostras teciduais de pacientes diagnosticados com COVID-19 por imunofluorescência, observamos que o parênquima pulmonar de pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresenta puncta de NLRP3 e ASC em células endoteliais (CD34+), macrófagos (CD64+) e células ciliadas (Figura 6 A-F). Tais dados evidenciam a ativação do inflamassoma em diferentes tipos celulares, assim como complementam os resultados obtidos pelas das análises de Imunohistoquímica.

Além disso, não evidenciamos diferenças numéricas de células endoteliais e macrófagos nos tecidos pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19, Influenza e adenocarcinoma (Figura 6 G,H). Observamos que o parênquima pulmonar de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresenta maior número de células endoteliais e macrófagos com puncta de ASC e NLRP3, representando a maior ativação do inflamassomas nestes tipos celulares quando comparado com pacientes diagnosticados com influenza ou adenocarcinoma (Figura 6 I-L).

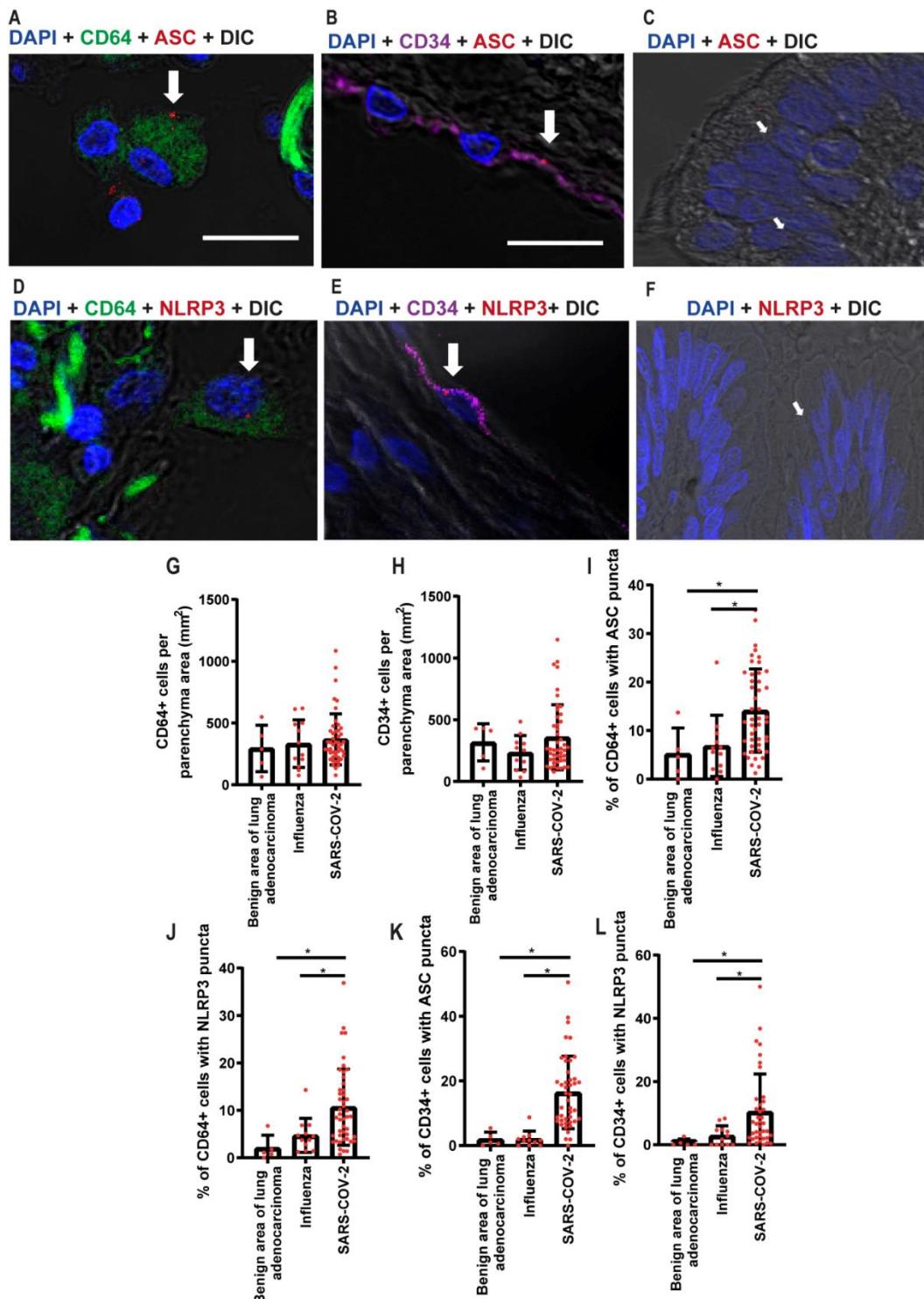


Figura 6: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em macrófagos, células endoteliais e células ciliadas. (A-F) A ativação do inflamassoma de NLRP3 e ASC foi detectada em células endoteliais, macrófagos e células ciliadas por meio de Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-NLRP3, anti-ASC, anti-CD64 e anti-CD34 em amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19, Influenza e adenocarcinoma. (G-L) Células endoteliais (CD34), macrófagos (CD64) e os puncta de ASC e NLRP3 foram quantificados pela da análise das imagens pelo software Zen

Blue e a quantificação foi normalizada por mm² de área de parênquima pulmonar. A figura expressa a mediana e o desvio padrão, a significância foi calculada utilizando o teste Kruskal Wallis.

4.5. Ativação do inflamassoma ocorre em diversos órgãos de pacientes com COVID-19

Realizamos a análise de amostras de tecido adiposo (Figura 7 F-H), baço (Figura 7 I-K), fígado (Figura 7 L-N) e rim (Figura 7 O-Q) de pacientes diagnosticados com COVID-19. Por meio da técnica SIMPLE observamos que tais tecidos apresentam infecção por SARS-CoV-2, assim como expressão de NLRP3 e ASC ambos componentes do inflamassoma. Foi observado por imunofluorescência a presença de puncta de ASC e NLRP3 em tecido adiposo (Figura 7 G,H), baço (Figura 7 J,K), fígado (Figura 7 M,N) e rim (Figura 7 P,Q) de pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Entretanto, ao quantificar a área de marcação por SIMPLE e número de puncta de ASC e NLRP3 (Figura 7 A-E), não observamos diferenças entre os diferentes tecidos oriundos de pacientes diagnosticados com COVID-19.

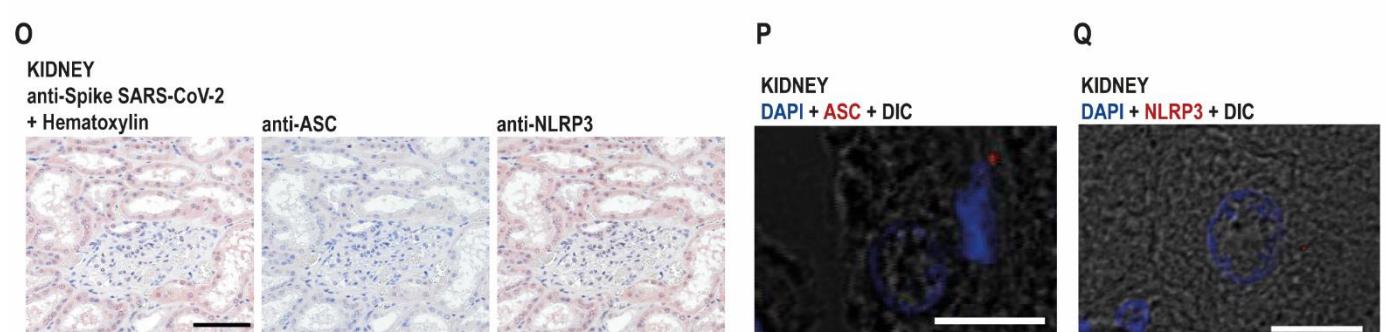
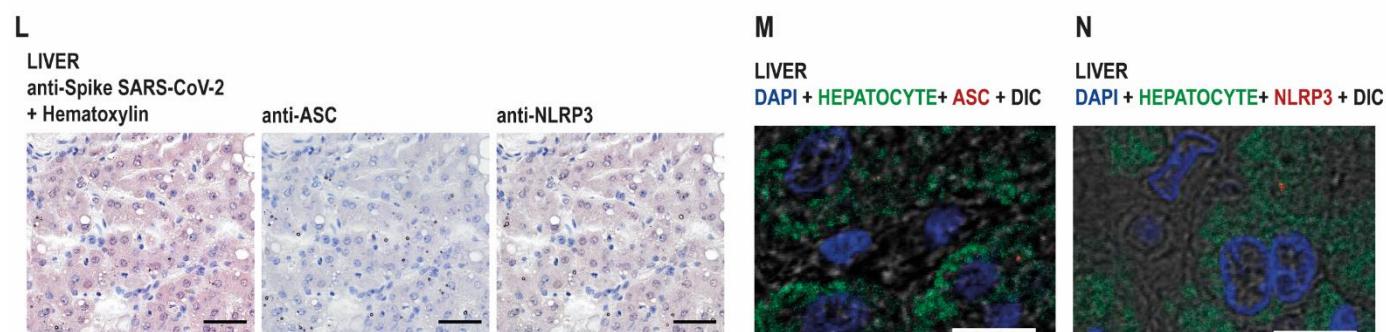
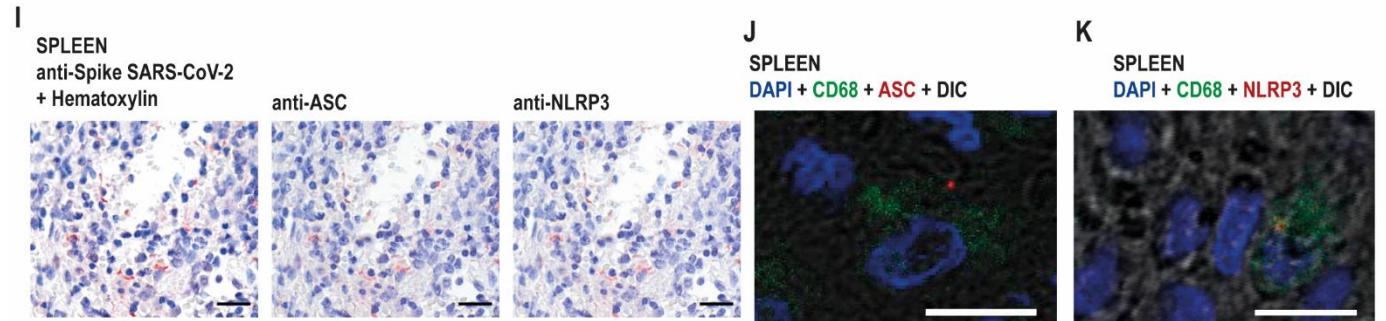
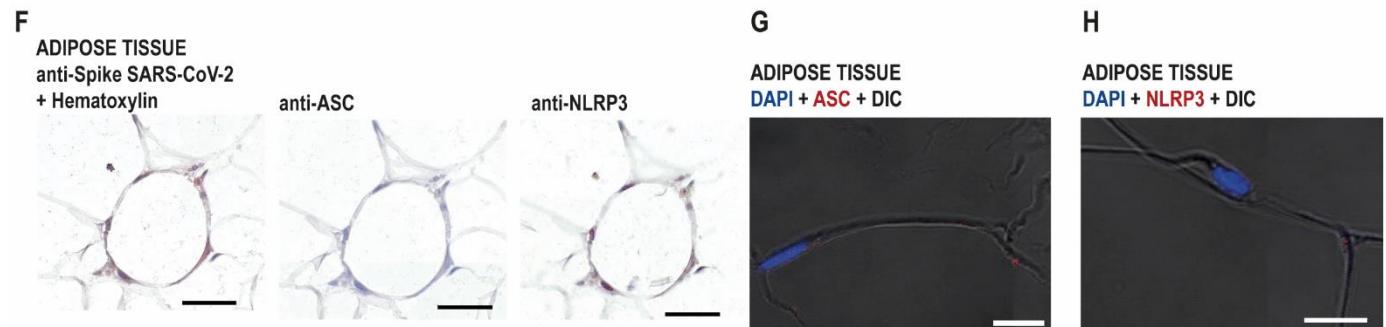
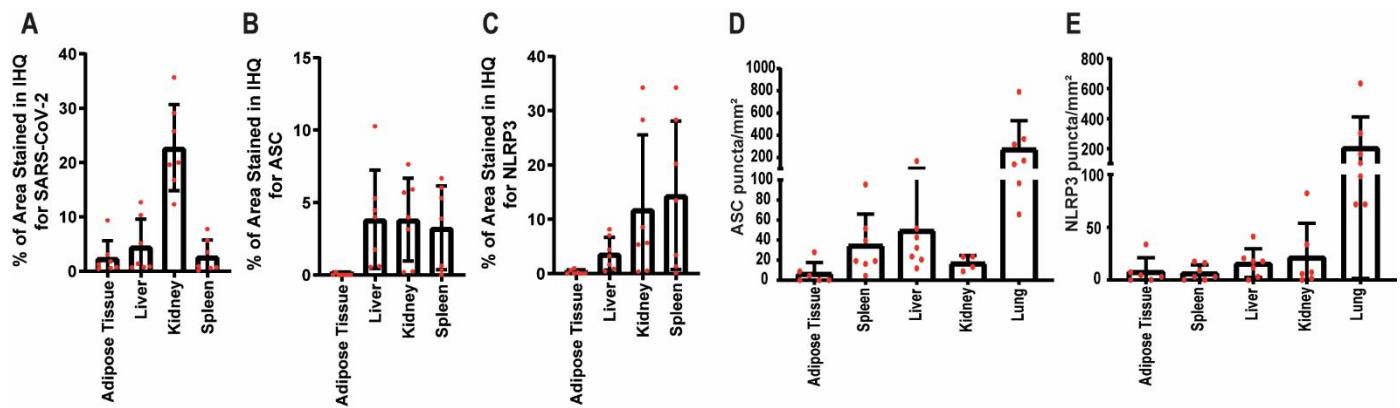


Figura 7: Pacientes que faleceram por COVID-19 apresentam expressão de componentes e ativação do inflamassoma de NLRP3 em tecido adiposo, baço, fígado e rins. (A-E) A expressão e ativação do inflamassoma de NLRP3 e ASC foi quantificada em tecido adiposo, baço, fígado e rins por meio de Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-NLRP3, anti-ASC e anti-SARS-CoV-2 em amostras teciduais pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19. Os puncta de ASC e NLRP3 foram quantificados por meio da análise das imagens pelos software Zen Blue, a quantificação foi normalizada por mm^2 de área de parênquima pulmonar. A figura expressa a mediana e o desvio padrão, a significância foi calculada utilizando o teste Kruskal Wallis. (F-Q) A expressão e ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 foram detectados por SIMPLE e imunofluorescência. As imagens foram analisadas pelos softwares Olyvia, Image J e Zen Blue.

4.6. A ativação do inflamassoma correlaciona positivamente com o tempo de internação do paciente e com a piora na função pulmonar

Realizamos análises de correlação entre o número de puncta de ASC e NLRP3 no parênquima pulmonar com carga viral (cópias das proteínas N2 e E), tempo de doença, tempo de intubação, taxa respiratória, temperatura, ph sanguíneo, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, A-aO_2 e Qs/Qt (Figura 8).

Por meio da construção de gráficos de correlação, observamos que a ativação do inflamassoma é proporcional ao tempo de sobrevida dos pacientes, e que quanto maior o número de puncta de NLRP3, pior é a função pulmonar dos pacientes. Além disso, também demonstramos que o tempo de doença é inversamente proporcional à carga viral (Figura 8 I).

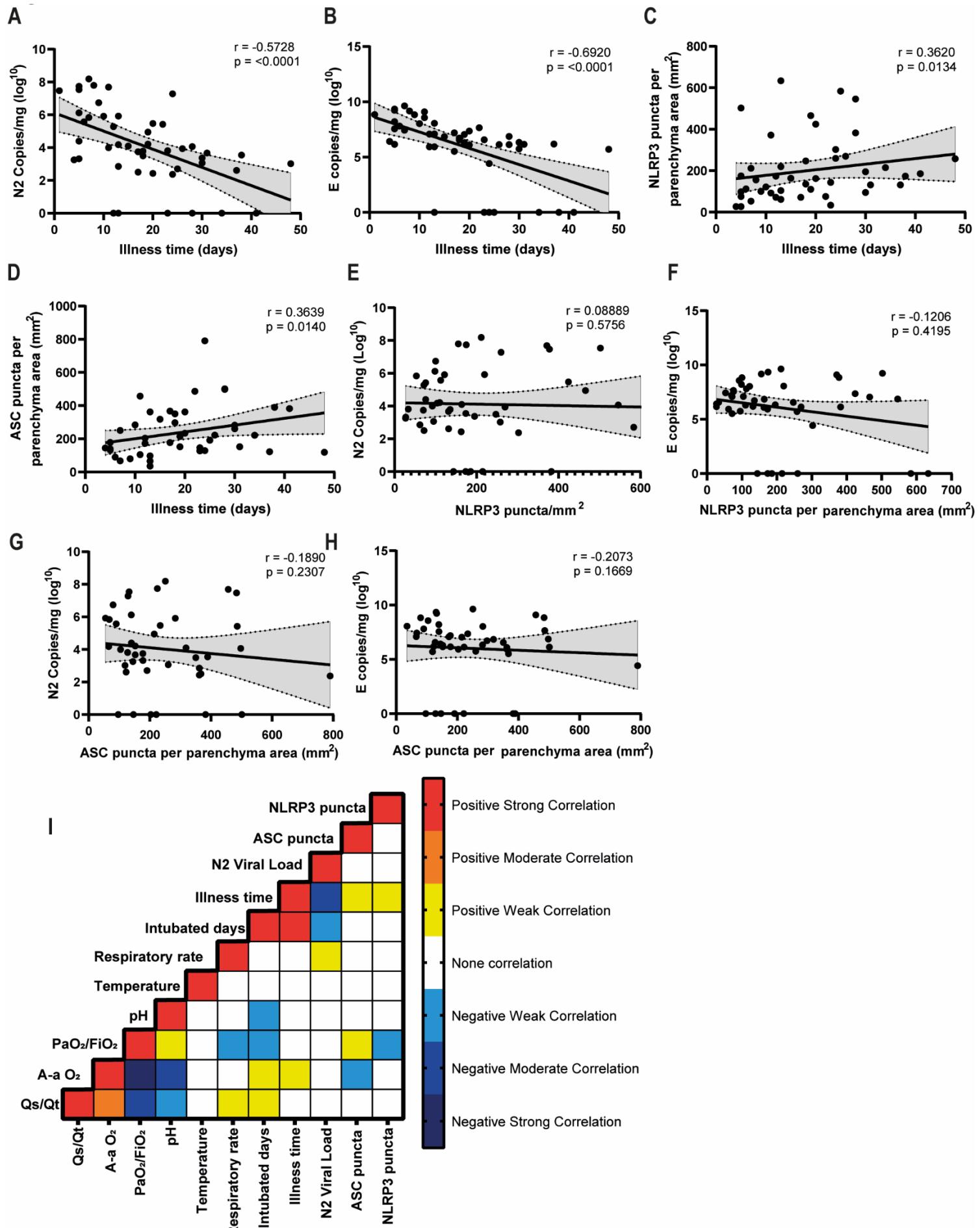


Figura 8: Em casos letais de COVID-19, a ativação do inflamassoma correlaciona ao tempo de sobrevida de pacientes diagnosticados com COVID-19. (A-H) Foram feitas correlações de Pearson entre punctas de ASC e NLRP3, carga viral, tempo de doença, tempo de intubação, taxa respiratória, temperatura, ph, P_aO_2/FiO_2 , A-a O_2 e Qs/Qt. (I) Matriz de correlação indicando correlações positivas (Amarelo, laranja, vermelho) e correlações negativas (Azul).

5. Discussão

O inflamassoma de NLRP3 é ativado diante de diferentes infecções virais, como Mayaro vírus, vírus Zika e SARS-CoV (Wang *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; De Castro-Jorge *et al.*, 2019). Além disso, a alta similaridade entre os vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2 proporcionou evidências para a possível ativação do inflamassoma de NLRP3 durante a COVID-19 (Lu *et al.*, 2020).

Estudos recentes demonstraram que o inflamassoma de NLRP3 é ativo frente à infecção por SARS-CoV-2 e associa-se à piora dos casos de pacientes com COVID-19 (Rodrigues *et al.*, 2021). A fim de avaliar a fundo o papel do inflamassoma de NLRP3 na patogênese da infecção por SARS-CoV-2, este estudo investigou a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em autópsias de pacientes diagnosticados com COVID-19, e comparou os achados com autópsias de pacientes diagnosticados com influenza e adenocarcinoma.

O vírus SARS-CoV-2 assemelha-se ao vírus Influenza em diversos aspectos como infecção do trato respiratório, transmissão, possuir RNA como material genético e sintomas ocasionados (Manzanares-Meza and Medina-Contreras, 2020). Ademais, também foi descrito que o vírus Influenza ocasiona a ativação do inflamassoma de NLRP3 (Ichinohe *et al.*, 2010). Frente a isto, utilizamos autópsias de pulmão de pacientes que faleceram por infecção do vírus Influenza para comparar a ativação do inflamassoma nas duas infecções virais. Além disso, áreas benignas de amostras pulmonares de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma também foram utilizadas para comparar a ativação do inflamassoma, constituindo assim o controle não viral para o nosso estudo.

Por meio da técnica SIMPLE observamos que amostras pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam marcação para o vírus SARS-CoV-2, assim como expressão para os componentes do inflamassoma: NLRP3, ASC, Caspase 1, IL-1 β e Gasdermina D clivada em células endoteliais e macrófagos. Além disso, observamos que pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam maior porcentagem de área marcada para Gardermina D clivada, IL-1 β e caspase 1 quando comparado com pacientes Influenza, evidenciando que tais componentes do inflamassoma são mais expressos na infecção por SARS-CoV-2.

Evidenciou-se que autópsias de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam maiores níveis de Gasdermina-D clivada majoritariamente em macrófagos pulmonares, um indicador de liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , e morte celular por piroptose (Zhang *et al.*, 2021). A liberação de IL-1 β por sua vez, relaciona-se ao recrutamento de células pró-inflamatórias que em casos extremos ocasiona dano tecidual e fibrose pulmonar (Patton *et al.*, 1995; Kolb *et al.*, 2001). Além disso, os níveis séricos de IL-1 β de pacientes diagnosticados com COVID-19 são maiores que pacientes saudáveis, e assemelham-se entre pacientes diagnosticados com COVID-19, ARDS e sepse, o que evidencia o papel desta citocina em diferentes quadros patológicos (Huang *et al.*, 2020; Wilson *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2021). Uma vez que a IL-1 β relaciona-se ao aumento da resposta inflamatória, diferentes estudos visam fármacos capazes de bloquear o receptor de IL-1 como possível mecanismo para diminuir a resposta inflamatória frente ao vírus SARS-CoV-2 (Cauchois *et al.*, 2020; Cavalli *et al.*, 2020; CORIMUNO-ANA, 2021). Também foi demonstrado que monócitos oriundos de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam aumento da ativação de caspase-1 e morte celular com lise de membrana, características essas que se relacionam à ativação do inflamassoma (Ferreira AC, Soares VC, 2021).

Frente à ativação do inflamassoma de NLRP3, há a oligomerização do componente sensor (NLRP3), componente adaptador (ASC) e a caspase inflamatória (Caspase 1) formando uma estrutura denominada puncta (Rodrigues *et al.*, 2021). Uma vez que o puncta representa a ativação do inflamassoma, avaliamos por imunofluorescência a presença e a quantificação de puncta de ASC e NLRP3 em autópsias de pacientes infectados por SARS-CoV-2, influenza e diagnosticados com adenocarcinoma. Observamos que diferentemente de pacientes que possuíam adenocarcinoma pulmonar e influenza, pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam maior ativação de ASC e NLRP3.

Estudos mostram que a proteína viral formadora de canais iônicos ORF3a gera a ativação do inflamassoma de NLRP3 frente a infecção por SARS-CoV1, tal proteína formadora de canais iônicos na membrana celular também aumenta a piroptose e liberação de IL-1 β e IL-18 em macrófagos infectados por SARS-CoV-2 (Chen *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). Observou-se também a participação da proteína viral N na

ativação do inflamassoma de NLRP3 durante a infecção de macrófagos por SARS-CoV-2, assim como seu papel frente ao aumento da maturação de IL-1 β e do dano pulmonar (Pan *et al.*, 2021). Além disso, a infecção por SARS-CoV-2 ocasiona a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), um conhecido ativador do inflamassoma de NLRP3 (D'agnillo *et al.*, 2021; Broz and Dixit, 2016). Tais dados sugerem diferentes mecanismos para a ativação do inflamassoma de NLRP3 durante a COVID-19.

Autópsias pulmonares de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam número elevado de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (Delorey *et al.*, 2021). Além disso, células endoteliais pertencentes ao pulmão, rins e coração expressam o receptor ACE2 e são infectadas por SARS-CoV-2, ocasionando inflamação e dano endotelial difuso (Varga *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Também foi demonstrado que pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam altos níveis de RNA viral em monócitos e macrófagos pulmonares, indicativos da infecção viral em tais células (Delorey *et al.*, 2021). Frente a tais dados, uma vez que observamos por SIMPLE a expressão dos componentes do inflamassoma em células endoteliais e macrófagos, resolvemos avaliar por imunofluorescência a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 nestes tipos celulares. Demonstramos que pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam maior número de puncta, ou seja, maior ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em células endoteliais e macrófagos quando comparados com pacientes influenza e adenocarcinoma. Tal dado pode estar relacionado à piora da função pulmonar nestes pacientes e correlaciona-se ao dano endotelial, uma vez que além das consequências da infecção por SARS-CoV-2 tais células estariam morrendo por piroptose.

Foi evidenciado que monócitos infectados por SARS-CoV-2 quando tratados com inibidores dos receptores de NLRP3, caspase-1 e IL-1 β apresentam diminuição dos níveis de IL-6 e TNF- α , dado este que caracteriza o papel do inflamassoma na liberação de citocinas responsáveis pelo perfil pró-inflamatório frente à infecção, e dano pulmonar difuso (Ferreira *et al.*, 2021). Além disso, macrófagos infectados por SARS-CoV-2 também apresentam maior secreção de IL- β , e produção de IL-6 de maneira dependente à ativação do inflamassoma de NLRP3 pela proteína viral N (Pan *et al.*, 2021).

Dentro os diferentes tipos celulares do sistema respiratório, as células ciliadas constituem um importante mecanismo de proteção, uma vez que participam do transporte do muco e mantimento da homeostase do trato respiratório (AIRES, Margarida., 2012). As células ciliadas são um dos principais tipos celulares que co-expresam ACE2 e TMPRSS2 no pulmão, ambos importantes fatores para a infecção por SARS-CoV-2 (Ziegler *et al.*, 2020). Ademais, tais células são infectadas por SARS-CoV-2 e apresentam como consequência alterações morfológicas, perda rápida dos cílios e consequentemente sua ação no transporte do muco é afetada (Robinot *et al.*, 2021). Dessa forma, procuramos avaliar a infecção de células ciliadas por SARS-CoV-2, assim como a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 neste tipo celular.

Por meio da técnica SIMPLE, observamos que células ciliadas de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam infecção por SARS-CoV-2 e expressão dos diferentes componentes do inflamassoma: NLRP3, ASC, Caspase1, IL-1B e Gasdermina-D. Além disso, por meio da imunofluorescência demonstramos que as células ciliadas de pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3. A perda dos cílios em tais células pode auxiliar o disseminação viral nas vias aéreas inferiores, uma vez que o vírus SARS-CoV-2 continuaria danificando células ciliadas e impedindo o direcionamento do muco à faringe, resultando na infecção dos alvéolos por exemplo (Robinot *et al.*, 2021). Assim, acreditamos que células ciliadas infectadas por SARS-CoV-2 apresentam alterações morfológicas como consequência da ativação do inflamassoma e subsequente morte celular por piroptose. Contudo, experimentos *in vivo* e *in vitro* são necessários para comprovar esta hipótese.

Sabe-se que diferentes órgãos são infectados pelo vírus SARS-CoV-2, uma vez que o tropismo celular deste vírus se associa majoritariamente a tipos celulares que expressam seu receptor ACE2 (Zou *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Entretanto, pouco se sabe sobre a relevância da ativação do inflamassoma em tais tecidos. Desta forma, por meio da análise de amostras teciduais de pacientes diagnosticados com COVID-19 por SIMPLE e imunofluorescência, observamos expressão e ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 em tecido adiposo, baço, rim e fígado destes pacientes. Tais dados evidenciam que há infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e ativação

do inflamassoma em diferentes tecidos, o que pode relacionar-se ao mantimento do perfil inflamatório destes pacientes.

Após analisar a ativação do inflamassoma na infecção por SARS-CoV-2, realizamos correlações entre ativação do inflamassomas e diversos dados clínicos disponíveis no prontuário de pacientes diagnosticados com COVID-19. Análises laboratoriais identificaram valores sorológicos acima do usual para dímero D, creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), glicose e lactato desidrogenase (LDH). O aumento da quantificação de LDH, dímero D, AST e ALT são frequentes em 41,0%, 43,2%, 22,2% e 21,3% dos casos respectivamente, e relacionam-se a lesão pulmonar e hepática, e aumento da coagulação (SBAC, 2020). Além disso, níveis altos de dímero D também se relacionam a um prognóstico desfavorável em quadros graves de infecção por SARS-CoV-2 (Tang *et al.*, 2020).

Pacientes infectados por SARS-CoV-2 recrutados para o estudo apresentam em média 33,6% de área pulmonar com dano alveolar difuso (DAD), além de 30% de área pulmonar com fibrose o que vai ao encontro de estudos que demonstraram DAD e fibrose em autópsias de pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Rendeiro *et al.*, 2020; Konopka KE *et al.*, 2020). Também observamos que em média, os pacientes apresentaram obesidade de grau I (IMC=31,11), o que foi demonstrado ser um fator determinante na gravidade da doença (Petrilli CM, *et al.*, 2020). Frente a isto, visamos investigar a possível relação entre a piora da função pulmonar e ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3. Por meio de uma correlação de Pearson, relacionamos o número de puncta de ASC e NLRP3, a carga viral, o tempo de doença, dias intubados, taxa respiratória, temperatura, Ph sanguíneo, e diferentes medidas de oxigenação: $P_{a}O_2/FiO_2$, A-A O_2 e Qs/Qt.

Nossos achados evidenciaram que a carga viral de pacientes infectados por SARS-CoV-2 é inversamente proporcional ao tempo de doença, dado este que vai ao encontro de diferentes estudos (Desai *et al.*, 2020; Walsh *et al.*, 2020). Também observamos que o número de puncta de ASC e NLRP3 é proporcional ao tempo de doença, ou seja, pacientes com maior ativação do inflamassoma apresentam maior sobrevida. Além disso, observamos uma correlação negativa entre puncta de NLRP3

e taxa de oxigenação, mostrando que quanto maior a ativação do inflamassoma de NLRP3, pior é a função pulmonar.

Frente a estas correlações, podemos afirmar que quanto maior é o tempo de sobrevida dos pacientes diagnosticados com COVID-19, maior é a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 e consequentemente menor é a carga viral. Isto implica em uma resposta imune desregulada, uma vez que a inflamação persiste, mas a carga viral está em declínio. Além disso, diferentes pontos devem ser observados como a ativação do inflamassoma frente a Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPS) oriundos do dano ocasionada pela infecção viral.

6. Conclusões

Evidenciamos neste estudo que a infecção por SARS-CoV-2 é identificada no parênquima pulmonar e em diferentes tipos celulares como macrófagos, endotélio e células ciliadas. Além disso, a infecção também atinge outros tecidos como baço, fígado, rins e tecido adiposo. Ademais, os achados do estudo demonstram que a infecção por SARS-CoV-2 ocasiona a expressão e ativação dos componentes do inflamassoma de ASC e NLRP3 em diferentes tecidos e tipos celulares.

Por meio de análises de correlação evidenciamos que a ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3 correlaciona-se positivamente com o tempo de sobrevida. Ademais, observamos uma correlação negativa entre puncta de NLRP3 e taxa de oxigenação, assim como uma correlação negativa entre carga viral e tempo de sobrevida. Em suma, nossas análises evidenciam que pacientes diagnosticados com COVID-19 com alta sobrevida apresentam pouca carga viral, entretanto alta ativação do inflamassoma de ASC e NLRP3, o que contribui para o quadro inflamatório persistente. Além disso, alta quantificação de puncta de NLRP3, ou seja, alta ativação do inflamassoma relaciona-se à piora da função pulmonar provavelmente devido ao mantimento da inflamação e dano tecidual consequente.

7. Referências Bibliográficas

ABDELMOATY, M.; YEAPURI, P.; MACHHI, J.; OLSON, K. et al. Defining the Immune Responses for SARS-CoV-2-Human Macrophage Interactions. **bioRxiv**, Jul 15 2021.

ACKERMANN, M.; VERLEDEN, S. E.; KUEHNEL, M.; HAVERICH, A. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **N Engl J Med**, 383, n. 2, p. 120-128, Jul 9 2020.

AIRES, Margarida. Fisiologia da respiração: Organização Morfológica do sistema respiratório. In: FISIOLOGIA. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 39, p. 602-604.

BERNARD, G. R.; ARTIGAS, A.; BRIGHAM, K. L.; CARLET, J. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **Am J Respir Crit Care Med**, 149, n. 3 Pt 1, p. 818-824, Mar 1994.

BERNARD, I.; LIMONTA, D.; MAHAL, L. K.; HOBMAN, T. C. Endothelium Infection and Dysregulation by SARS-CoV-2: Evidence and Caveats in COVID-19. **Viruses**, 13, n. 1, Dec 26 2020.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, 16, n. 7, p. 407-420, Jul 2016.

BUSTAMANTE-MARIN, X. M.; OSTROWSKI, L. E. Cilia and Mucociliary Clearance. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 9, n. 4, Apr 3 2017.

CAUCHOIS, R.; KOUBI, M.; DELARBRE, D.; MANET, C. et al. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117, n. 32, p. 18951-18953, Aug 11 2020.

CAVALLI, G.; DAGNA, L. The right place for IL-1 inhibition in COVID-19. **Lancet Respir Med**, 9, n. 3, p. 223-224, Mar 2021.

CAVALLI, G.; DE LUCA, G.; CAMPOCHIARO, C.; DELLA-TORRE, E. et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. **Lancet Rheumatol**, 2, n. 6, p. e325-e331, Jun 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. COVID-19 Symptoms. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html> acessado em 21/11/2021

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Naming the 2019 Coronavirus. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/information/w/news/1300/page> acessado em 21/11/2021

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs). Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/naats.html> acessado em 21/11/2021

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Testing Overview. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html> acessado em 21/11/2021

CHEN, H.; LIU, W.; WANG, Y.; LIU, D. *et al.* SARS-CoV-2 activates lung epithelial cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients. **EBioMedicine**, 70, p. 103500, Aug 2021.

CHEN, I. Y.; MORIYAMA, M.; CHANG, M. F.; ICHINOHE, T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. **Front Microbiol**, 10, p. 50, 2019.

CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X.; QU, J. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, 395, n. 10223, p. 507-513, Feb 15 2020.

CONG, Y.; ULASLI, M.; SCHEPERS, H.; MAUTHE, M. *et al.* Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. **J Virol**, 94, n. 4, Jan 31 2020.

D'AGNILLO, F.; WALTERS, K. A.; XIAO, Y.; SHENG, Z. M. *et al.* Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. **Sci Transl Med**, p. eabj7790, Oct 14 2021.

DE CASTRO-JORGE, L. A.; DE CARVALHO, R. V. H.; KLEIN, T. M.; HIROKI, C. H. *et al.* The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. **PLoS Pathog**, 15, n. 9, p. e1007934, Sep 2019.

DE HAAN, C. A.; ROTTIER, P. J. Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. **Adv Virus Res**, 64, p. 165-230, 2005.

DE WIT, E.; VAN DOREMALEN, N.; FALZARANO, D.; MUNSTER, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nat Rev Microbiol**, 14, n. 8, p. 523-534, Aug 2016.

DELOREY, T. M.; ZIEGLER, C. G. K.; HEIMBERG, G.; NORMAND, R. *et al.* COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. **Nature**, 595, n. 7865, p. 107-113, Jul 2021.

DESAI, N.; NEYAZ, A.; SZABOLCS, A.; SHIH, A. R. *et al.* Temporal and Spatial Heterogeneity of Host Response to SARS-CoV-2 Pulmonary Infection. **medRxiv**, Aug 2 2020.

DOMBROWSKI, Y.; PERIC, M.; KOGLIN, S.; KAMMERBAUER, C. *et al.* Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. **Sci Transl Med**, 3, n. 82, p. 82ra38, May 11 2011.

Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. **Lancet Respir Med**, 9, n. 3, p. 295-304, Mar 2021.

FANG, R.; UCHIYAMA, R.; SAKAI, S.; HARA, H. *et al.* ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. **Mucosal Immunol**, 12, n. 5, p. 1092-1103, Sep 2019.

FERREIRA, A. C.; SOARES, V. C.; DE AZEVEDO-QUINTANILHA, I. G.; DIAS, S. *et al.* SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discov**, 7, n. 1, p. 43, Mar 1 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Coronavirus Disease 2019 Testing Basics. Disponível em: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/coronavirus-disease-2019-testing-basics> acessado em 21/11/2021

FREEMAN, T. L.; SWARTZ, T. H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. **Front Immunol**, v. 11, p. 1518, 2020.

FUSCO, R.; SIRACUSA, R.; GENOVESE, T.; CUZZOCREA, S. *et al.* Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases. **Int J Mol Sci**, 21, n. 12, Jun 13 2020.

GAUSSEN, A.; HORNBY, L.; ROCKL, G.; O'BRIEN, S. *et al.* Evidence of SARS-CoV-2 Infection in Cells, Tissues, and Organs and the Risk of Transmission Through Transplantation. **Transplantation**, 105, n. 7, p. 1405-1422, Jul 1 2021.

HAAKE, C.; COOK, S.; PUSTERLA, N.; MURPHY, B. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. **Viruses**, 12, n. 9, Sep 13 2020.

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

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, 181, n. 2, p. 271-280.e278, Apr 16 2020.

HOLMES, K. V. CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE). In: **Encyclopedia of Virology**: Copyright © 1999 Elsevier Ltd. All rights reserved., 1999. p. 291-298.

HORNUNG, V.; ABLASSER, A.; CHARREL-DENNIS, M.; BAUERNFEIND, F. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. **Nature**, 458, n. 7237, p. 514-518, Mar 26 2009.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 3, p. 141-154, Mar 2021.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 395, n. 10223, p. 497-506, Feb 15 2020.

HUI, K. P. Y.; CHEUNG, M. C.; PERERA, R.; NG, K. C. *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. **Lancet Respir Med**, 8, n. 7, p. 687-695, Jul 2020a.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nat Immunol**, 11, n. 5, p. 404-410, May 2010.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Coronaviridae. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae acessado em 21/11/2021

ITHETE, N. L.; STOFFBERG, S.; CORMAN, V. M.; COTTONTAIL, V. M. *et al.* Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. In: **Emerg Infect Dis**, 2013. v. 19, p. 1697-1699.

KELLEY, N.; JELTEMA, D.; DUAN, Y.; HE, Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**, 20, n. 13, Jul 6 2019.

KHAN, J.; ASOOM, L. I. A.; KHAN, M.; CHAKRABARTTY, I. *et al.* Evolution of RNA viruses from SARS to SARS-CoV-2 and diagnostic techniques for COVID-19: a review. **Beni Suef Univ J Basic Appl Sci**, 10, n. 1, p. 60, 2021b.

KOEPPEN, B.M. e STANTON, B.A. **BERNE & LEVY Fisiologia**, Elsevier , 6ed., 2009. cap. 20, p. 417-429.

KOLB, M.; MARGETTS, P. J.; ANTHONY, D. C.; PITOSSI, F. *et al.* Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. **J Clin Invest**, 107, n. 12, p. 1529-1536, Jun 2001.

KOMMOSS, F. K. F.; SCHWAB, C.; TAVERNAR, L.; SCHRECK, J. *et al.* The Pathology of Severe COVID-19-Related Lung Damage. **Dtsch Arztebl Int**, 117, n. 29-30, p. 500-506, Jul 20 2020.

KONOPKA, K. E.; NGUYEN, T.; JENTZEN, J. M.; RAYES, O. *et al.* Diffuse alveolar damage (DAD) resulting from coronavirus disease 2019 Infection is Morphologically Indistinguishable from Other Causes of DAD. **Histopathology**, 77, n. 4, p. 570-578, Oct 2020.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W. *et al.* Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, 310, n. 5748, p. 676-679, Oct 28 2005.

LIAO, M.; LIU, Y.; YUAN, J.; WEN, Y. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nat Med**, 26, n. 6, p. 842-844, Jun 2020.

LIU, J.; LI, Y.; LIU, Q.; YAO, Q. *et al.* SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. In: **Cell Discov**, 2021. v. 7, p. 17.

LIU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, C.; HUANG, F. *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Sci China Life Sci**, 63, n. 3, p. 364-374, Mar 2020.

LONDON HEALTH SCIENCES CENTRE. Central Venous/Micex Venous oxygen Saturation. Disponível em: <https://www.lhsc.on.ca/critical-care-trauma-centre/central-venous/mixed-venous-oxygen-saturation> Acessado em 22/11/2021

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, 395, n. 10224, p. 565-574, Feb 22 2020.

MANZANARES-MEZA, L. D.; MEDINA-CONTRERAS, O. SARS-CoV-2 and influenza: a comparative overview and treatment implications. **Bol Med Hosp Infant Mex**, v. 77, n. 5, p. 262-273, 2020. ISSN 0539-6115.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil confirma primeiro caso da doença. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/brasil-confirma-primeiro-caso-de-novo-coronavirus> acessado em 22/11/2021

MORIYAMA, M.; NAGAI, M.; MARUZURU, Y.; KOSHIBA, T. *et al.* Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes. **iScience**, 23, n. 7, p. 101270, Jul 24 2020.

O'BRIEN, W. T.; PHAM, L.; SYMONS, G. F.; MONIF, M. *et al.* The NLRP3 inflammasome in traumatic brain injury: potential as a biomarker and therapeutic target. **J Neuroinflammation**, 17, n. 1, p. 104, Apr 6 2020.

OU, X.; LIU, Y.; LEI, X.; LI, P. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 1620, Mar 27 2020.

PAN, P.; SHEN, M.; YU, Z.; GE, W. *et al.* SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 4664, Aug 2 2021.

PARK, E.; NA, H. S.; SONG, Y. R.; SHIN, S. Y. *et al.* Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by Porphyromonas gingivalis infection. **Infect Immun**, 82, n. 1, p. 112-123, Jan 2014.

PATTON, L. M.; SAGGART, B. S.; AHMED, N. K.; LEFF, J. A. *et al.* Interleukin-1 beta-induced neutrophil recruitment and acute lung injury in hamsters. **Inflammation**, 19, n. 1, p. 23-29, Feb 1995.

PETERSEN, E.; KOOPMANS, M.; GO, U.; HAMER, D. H. *et al.* Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. **Lancet Infect Dis**, 20, n. 9, p. e238-e244, Sep 2020.

PETRILLI, C. M.; JONES, S. A.; YANG, J.; RAJAGOPALAN, H. *et al.* Factors associated with hospital admission and critical illness among 5279 people with coronavirus disease 2019 in New York City: prospective cohort study. **Bmj**, 369, p. m1966, May 22 2020.

PEYTON, P. J.; ROBINSON, G. J.; MCCALL, P. R.; THOMPSON, B. Noninvasive measurement of intrapulmonary shunting. **J Cardiothorac Vasc Anesth**, 18, n. 1, p. 47-52, Feb 2004.

RATHINAM, V. A.; JIANG, Z.; WAGGONER, S. N.; SHARMA, S. *et al.* The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. **Nat Immunol**, 11, n. 5, p. 395-402, May 2010.

REID, L. M.; JONES, R. Mucous membrane of respiratory epithelium. **Environ Health Perspect**, 35, p. 113-119, Apr 1980.

RENDEIRO, A. F.; RAVICHANDRAN, H.; BRAM, Y.; CHANDAR, V. *et al.* The spatial landscape of lung pathology during COVID-19 progression. **Nature**, 593, n. 7860, p. 564-569, May 2021.

ROBINOT, R.; HUBERT, M.; DE MELO, G. D.; LAZARINI, F. *et al.* SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 4354, Jul 16 2021.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **J Exp Med**, v. 218, n. 3, Mar 1 2021.

RUAN, Q.; YANG, K.; WANG, W.; JIANG, L. *et al.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *In: Intensive Care Med*, 2020. v. 46, p. 846-848.

RÜHL, S.; BROZ, P. The gasdermin-D pore: Executor of pyroptotic cell death. *In: Oncotarget*, 2016. v. 7, p. 57481-57482.

SATIJA, N.; LAL, S. K. The molecular biology of SARS coronavirus. **Ann NY Acad Sci**, 1102, n. 1, p. 26-38, Apr 2007.

SATIŞ, H.; ÖZGER, H. S.; AYSERT YILDIZ, P.; HIZEL, K. *et al.* Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. **Cytokine**, 137, p. 155302, Jan 2021.

SHARMA, M.; DE ALBA, E. Structure, Activation and Regulation of NLRP3 and AIM2 Inflammasomes. **Int J Mol Sci**, 22, n. 2, Jan 16 2021.

SHI, J.; ZHAO, Y.; WANG, K.; SHI, X. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, 526, n. 7575, p. 660-665, Oct 29 2015.

SIMS, A. C.; BARIC, R. S.; YOUNT, B.; BURKETT, S. E. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. **J Virol**, 79, n. 24, p. 15511-15524, Dec 2005.

SIU, K. L.; YUEN, K. S.; CASTAÑO-RODRIGUEZ, C.; YE, Z. W. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. **Faseb J**, 33, n. 8, p. 8865-8877, Aug 2019.

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Alterações laboratoriais em pacientes com COVID-19. Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/26/alteracoes-laboratoriais-em-pacientes-com-covid19/> acessado em 22/11/2021

SORBINI, C. A.; GRASSI, V.; SOLINAS, E.; MUIESAN, G. Arterial oxygen tension in relation to age in healthy subjects. **Respiration**, 25, n. 1, p. 3-13, 1968.

STERTZ, S.; REICHELT, M.; SPIEGEL, M.; KURI, T. *et al.* The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. **Virology**, 361, n. 2, p. 304-315, May 10 2007.

SUTER, P. M.; FAIRLEY, H. B.; SCHLOBOHM, R. M. Shunt, lung volume and perfusion during short periods of ventilation with oxygen. **Anesthesiology**, 43, n. 6, p. 617-627, Dec 1975.

TANG, N.; LI, D.; WANG, X.; SUN, Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **J Thromb Haemost**, 18, n. 4, p. 844-847, Apr 2020.

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 6, p. 363-374, Jun 2020.

TOLDO, S.; BUSSANI, R.; NUZZI, V.; BONAVENTURA, A. *et al.* Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. **Inflamm Res**, 70, n. 1, p. 7-10, Jan 2021.

VARGA, Z.; FLAMMER, A. J.; STEIGER, P.; HABERECKER, M. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **Lancet**, 395, n. 10234, p. 1417-1418, May 2 2020.

VORA, S. M.; LIEBERMAN, J.; WU, H. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. **Nat Rev Immunol**, 21, n. 11, p. 694-703, Nov 2021.

WALSH, K. A.; JORDAN, K.; CLYNE, B.; ROHDE, D. *et al.* SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. **J Infect**, 81, n. 3, p. 357-371, Sep 2020.

WANG, C.; XIE, J.; ZHAO, L.; FEI, X. *et al.* Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, 57, p. 102833, Jul 2020.

WANG, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, Mar 17 2020. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Available at: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32031570>>.

WANG, W.; LI, G.; DE, W.; LUO, Z. *et al.* Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 106, Jan 9 2018.

WANG, Y.; LIU, S.; LIU, H.; LI, W. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. **J Hepatol**, 73, n. 4, p. 807-816, Oct 2020.

WILSON, J. G.; SIMPSON, L. J.; FERREIRA, A. M.; RUSTAGI, A. *et al.* Cytokine profile in plasma of severe COVID-19 does not differ from ARDS and sepsis. **JCI Insight**, 5, n. 17, Sep 3 2020.

WÖLFEL, R.; CORMAN, V. M.; GUGGEMOS, W.; SEILMAIER, M. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, 581, n. 7809, p. 465-469, May 2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/> acessado em 21/11/2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays> acessado em 21/11/2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-

CoV). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1 acessado em 21/11/2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Transmission of SARS-CoV2: implications for infection prevention precautions. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions> acessado em 21/11/2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> acessado em 21/11/2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1 acessado em 21/11/2021

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, Feb 24 2020. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32091533>>.

XU, Z.; SHI, L.; WANG, Y.; ZHANG, J. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, 8, n. 4, p. 420-422, Apr 2020.

YIN, Y.; WUNDERINK, R. G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. **Respirology**, 23, n. 2, p. 130-137, Feb 2018.

ZHANG, B.; ZHOU, X.; QIU, Y.; SONG, Y. *et al.* Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. **PLoS One**, 15, n. 7, p. e0235458, 2020.

ZHANG, H.; LUO, J.; ALCORN, J. F.; CHEN, K. *et al.* AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality. **J Immunol**, 198, n. 11, p. 4383-4393, Jun 1 2017.

ZHANG, J.; WU, H.; YAO, X.; ZHANG, D. *et al.* Pyroptotic macrophages stimulate the SARS-CoV-2-associated cytokine storm. *In: Cell Mol Immunol*, 2021. v. 18, p. 1305-1307.

ZHANG, Y. Z.; HOLMES, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. **Cell**, 181, n. 2, p. 223-227, Apr 16 2020.

ZHAO, C.; ZHAO, W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses. **Front Immunol**, 11, p. 211, 2020.

ZHENG, M.; WILLIAMS, E. P.; MALIREDDI, R. K. S.; KARKI, R. *et al.* Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. **J Biol Chem**, 295, n. 41, p. 14040-14052, Oct 9 2020.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 579, n. 7798, p. 270-273, Mar 2020.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, 382, n. 8, p. 727-733, Feb 20 2020.

ZIEGLER, C. G. K.; ALLON, S. J.; NYQUIST, S. K.; MBANO, I. M. *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**, 181, n. 5, p. 1016-1035.e1019, May 28 2020.

ZOU, X.; CHEN, K.; ZOU, J.; HAN, P. *et al.* Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Front Med**, 14, n. 2, p. 185-192, Apr 2020.