## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

## TAMARA SILVA RODRIGUES

Importância do inflamassoma no desenvolvimento das formas graves de COVID-19 em pacientes e em modelo experimental murino

> Ribeirão Preto 2022

### TAMARA SILVA RODRIGUES

## Importância do inflamassoma no desenvolvimento das formas graves de COVID-19 em pacientes e em modelo experimental murino

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Ribeirão Preto 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Rodrigues, Tamara Silva

Importância do inflamassoma no desenvolvimento das formas graves de COVID-19 em pacientes e em modelo experimental murino, 2022.

133 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Zamboni, Dario Simões

SARS-CoV-2 2. COVID-19 3. Inflamassoma 4. NLRP3 5. CASP4
CASP11

Trabalho realizado no Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro do TDR/WHO, INCTV/CNPq, FAPESP e

CAPES

Nome: Tamara Silva Rodrigues

Título: Importância do inflamassoma no desenvolvimento das formas graves de COVID-

19 em pacientes e em modelo experimental murino

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### Banca Examinadora

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo Julgamento: \_\_\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_\_ Profa. Dra. Lúccia Faccioli Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo Julgamento: \_\_\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_\_ Profa. Dra. Patrícia Torres Bozza Instituição: Fiocruz RJ Julgamento: \_\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_\_ Prof. Dr. José Luiz Módena Instituição: Universidade de Campinas Julgamento: \_\_\_\_\_\_ Assinatura: "Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo." (Walter S. Landor)

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos". (Isaac Newton)

"Se quer ir mais rápido, vá sozinho. Se quer ir mais longe, vá em grupo" Provérbio africano

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos os professores que me incentivaram e fizeram parte da minha trajetória até aqui.

Este trabalho também é dedicado à todas as vítimas da COVID-19 e todos os pacientes que participaram do estudo.

#### AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me conceder força e sabedoria para persistir na busca pelos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Dario Simões Zamboni, por ter me permitido alçar voos altos durante os últimos quatro anos de doutorado. Muito obrigada pela confiança, por acreditar em mim, sempre viabilizando grandes oportunidades e me permitindo realizar projetos que me trouxeram um grande amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada por me ensinar a importância de um trabalho em equipe. Agradeço também por todos os ensinamentos científicos e pelo exemplo dado de como fazer ciência de qualidade no nosso país.

As fontes financiadoras: FAPESP (processo nº 2019/21978-5), INCTV/CNPq, CAPES, TDR/WHO, FAEPA e Pró-Reitoria de Pós-graduação, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

À todos os pacientes que participaram deste estudo permitindo o entendimento sobre os mecanismos por trás a gravidade da doença.

À todos os animais utilizados neste estudo que foram muito importantes para o esclarecimento de mecanismos importantes para patogênese da COVID-19.

À Maira Nakamura, por toda ajuda, eficiência e dedicação com as compras de reagentes necessários para a realização deste trabalho.

À Keyla Sá que teve um papel fundamental para o desenvolvimento desse trabalho desde o início da pandemia da COVID-19, sempre proativa e disposta a contribuir e ensinar as técnicas necessárias para o andamento deste projeto.

À Camila Caetano, pela amizade e disponibilidade. Muito obrigada por ter sido meu braço direito durante os experimentos com animais no biotério de segurança nível 3 (BSL3), trazendo leveza para a rotina diária.

À Adriene Ishimoto, pela amizade, disponibilidade e gentileza em ajudar prontamente para que conseguíssemos extrair o máximo de informações as partir de amostras raras de pacientes com COVID-19 grave.

À Letícia Almeida pelo companheirismo e ajuda nos experimentos realizados no BSL3. Muito obrigada por toda disponibilidade, pela amizade e pelos momentos de descontração, risadas, que tornaram meus dias mais divertidos e leves.

Π

À Amanda Becerra pela amizade e companheirismo, permanecendo horas no laboratório até que finalizássemos todas as atividades necessárias para o andamento desse trabalho.

A todos os demais colegas que fazem parte do grupo do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata (LPMII) em especial aqueles que colaboraram diretamente com esse estudo com muita dedicação e empenho: Warrison Andrade, Augusto V. Gonçalves, Leticia de Sousa Lopes, Samuel Oliveira e Danielle P.A. Mascarenhas. Também agradeço aos demais colegas e amigos de laboratório Isadora Mafra, Rhanoica, Mariana Chaves, Amanda Seribelli, Joaquim, Caroline Motta e Moisés que tornam o laboratório com um ambiente descontraído e colaborativo.

À Amanda Zuin, Josiane e Débora Perucello por toda ajuda com as genotipagens dos animais, preparo de reagentes e demais funcionalidades do laboratório que foram primordiais para a realização desse trabalho.

Aos colegas com quem convivi no meu primeiro ano de doutorado: Vitória, Robson, Leonardo, Gustavo, Ana Luísa, Luíza e Catarina. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e disponibilidade para ajudar sempre que necessário.

Também gostaria de agradecer em especial o Dr. Renan Villanova Homem de Carvalho, por todos os ensinamentos e conselhos durante meu primeiro ano de doutorado. Muito obrigada pela confiança e receptividade logo que cheguei ao laboratório em 2019. Também agradeço pelo exemplo de excelente cientista com quem tive a honra de compartilhar discussões que me motivaram a buscar fazer sempre uma ciência de qualidade.

Aos colegas de BLS3 pela excelente convivência e parceria, Hellen, Thaís, Rodrigo, Giovanni, Bruna, Daniel.

A Prof. Dra. Larissa Cunha, por toda dedicação na organização da logística das amostras dos pacientes com COVID-19 pela confiança e pela oportunidade de colaboração durante o meu doutorado no Grupo de COVID-19 no CRID.

Ao grupo da Prof. Larissa Cunha, especialmente Ana Salina, Douglas Santos e Marlon Fortes pela amizade, ensinamentos e colaboração realizada nos últimos anos.

Ao grupo do prof. Eurico Arruda, em especial Ronaldo Martins, Ítalo Castro e Marjorie Pontelli por toda disponibilidade para ensinar as técnicas de virologia para alguém que estava iniciando. Muito obrigada por toda paciência e colaboração. Ao grupo do prof. Eurico Arruda, em especial Ronaldo Martins, Ítalo Castro e Marjorie Pontelli por toda disponibilidade para ensinar as técnicas de virologia para alguém que estava iniciando. Muito obrigada por toda paciência e colaboração.

Aos demais pesquisadores do CRID que participaram diretamente para a realização de uma forca tarefa em 2020 em prol de uma pesquisa que contribuísse para a evolução do conhecimento sobre a COVID-19: Flavio P. Veras, Juliana E. Toller-Kawahisa, Daniele C. Nascimento, Mikhael H.F. de Lima, Camila M.S. Silva, Diego B. Caetite, Thiago M. Cunha, José C. Alves-Filho, Paulo Louzada-Junior e Fernando Q. Cunha.

Ao Daniel Macedo e as técnicas Soraya e Andreia por todo esforço para manutenção da organização e logística de uso do BSL3 do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP.

Aos amigos Bruna Manuella Silva, Giovanni Gomes e Josiane pela disponibilidade nos experimentos *in vivo* no BSL3.

Aos colegas de BLS3 pela excelente convivência e parceria: Hellen Anastácia, Thaís Melquiades, Giovanni Gomes, Bruna Manuella, Daniel Macedo e Rodrigo.

A Sabrina S. Batah e Alexandre T. Fabro por toda a prontidão em ajudarmos com as análises histopatológicas.

As professores Fabiani G. Frantz e Tiana Kohlsdorf que também contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

À Ana Cristine S. Ferreira, por toda paciência, dedicação, apoio e disponibilidade para ouvir e ajudar a solucionar os nossos problemas. Muito obrigada pelos conselhos, por acreditar em mim durante todos esses anos e sempre me incentivar na busca pelos meus sonhos.

A todos os Professores do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, que estiveram comigo desde 2017, quando iniciei o mestrado e que permaneceram presentes no doutorado, em especial a Profa. Dra. Vânia Deperon, que me orientou durante o mestrado e trabalhamos juntas novamente no doutorado durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Muito obrigada pelos ensinamentos científicos e por toda contribuição para a minha formação para prática docente através do PAE e por sempre me permitir visualizar da importância do ensino e extensão. Também gostaria de agradecer aos professores: Prof. Dr. Joao Santana, Profa. Dra. Vanessa Carregaro, Profa. Dra. Beatriz Ferreira, Profa. Dra. Isabel Kinney, Prof. Dr.

Marcelo Baruffi, Profa. Dra. Daniela Carlos e outros que estiveram presentes seja em discussões científicas durante o "Journal Club" ou em outras disciplinas ministradas durante o doutorado.

À professora Aparecida Nagao Dias por ter me feito amar a imunologia desde a graduação. Muito obrigada por me permitir sonhar e ir em busca de realizar esses sonhos. Graças ao impacto do seu trabalho eu tive a chance de chegar até aqui.

Aos técnicos do biotério, Júlio, Adriana, Edir e Rubilan por contribuírem com criação e fornecimento de animais necessários para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia e de Biologia Celular, em especial: Denise Ferraz, Roberta, Ana Flávia, Wendy, Izaíra, Aninha e Beth, pela ótima convivência que tivemos durantes esses 6 anos. Muito obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

A todos os pós-graduandos do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela troca durante os últimos anos, por sempre estarem abertos a colaborações com as pesquisas, pelas discussões científicas produtivas, tanto nos eventos internos do programa (Cursos de Inverno, Journal Club, Workshops, etc) quanto nos congressos anuais da SBI. Todos vocês contribuíram consideravelmente para minha formação.

À ex-presidente Dilma Rousseff por ter me possibilitado vivenciar experiencias científicas únicas fora do Brasil durante o Programa Ciência sem Fronteiras ainda na graduação, o que foi um divisor de águas para as minhas experiencias futuras que me permitiram estar hoje na melhor Universidade da América Latina.

#### Agradecimentos Especiais

Ao meu avô Francisco (in memorian) que sempre acreditou em mim e que me ensinou valores e características importantes que carrego comigo desde sempre: o trabalho árduo para conquistar os meus objetivos, mas sem esquecer da empatia com o outro, assim como a simplicidade e a humildade. Sou muito grata por todos os ensinamentos que sempre estarão presentes na minha vida pessoal e profissional.

À minha avó Minervina que esteve sempre presente na minha vida, que é a minha benção, meu alicerce e minha forca. Obrigada por ter me ensinado a ser forte, destemida e a ir atrás dos meus sonhos mantendo a tranquilidade e a fé. Ao meu amor e companheiro de vida, Ítalo Bonfim, que compartilha de todos os meus sonhos desde 2007, que vibra com as minhas conquistas e me impulsiona a buscar sempre o melhor visando um crescimento profissional e pessoal, mesmo que isso implique em suportar alguns quilômetros de distância. Obrigada por se fazer sempre presente e por fazer parte de todas as fases e ciclos da minha vida, inclusive este. Sou grata por todo amor, cuidado, carinho e parceria durante todos esses anos.

À minha mãe por ter me ensinado a voar desde cedo. Obrigada pelo amor incondicional, por acreditar em mim e por ser a melhor mãe que eu poderia ter.

Ao meu pai por todo o carinho e cuidado. Obrigada por torcer tanto pelo meu sucesso e acreditar sempre no meu potencial.

Aos meus sogros Ana e José, por todo amor e carinho.

À minha melhor amiga/irmã Isabel Guerra por ter me feito sentir mais em casa em Ribeirão Preto. Obrigada por todos os conselhos, conexões, conversas, risadas e companheirismo durante esses anos.

Ao meu amigo Ricardo Castro pelo companheirismo durante esses anos em Ribeirão Preto. Agradeço desde as colaborações científicas até as longas conversas diárias. Sou extremamente grata pela nossa conexão e amizade que levarei sempre comigo.

Ao meu amigo Yugo que acompanhou de perto as minhas fases profissionais, desde a graduação em Fortaleza, até a pós-graduação em Ribeirão Preto. Obrigada por trazer um pedacinho de Fortaleza para Ribeirão. Sou muito grata a vida por ter nos aproximado. Obrigada por me fazer sentir compreendia e acolhida. Obrigada por toda a torcida pelo meu sucesso sempre.

Ao meu amigo Jefferson Leite que foi um grande presente em minha vida. Um amigo para todas as horas e um exemplo de professor e pesquisador a ser seguido.

#### RESUMO

Introdução: Casos graves de COVID-19 são caracterizados por um forte processo inflamatório que pode levar à falência de órgãos e morte do paciente. O inflamassoma de NLRP3 é uma plataforma molecular que promove a inflamação através da clivagem e da ativação das principais moléculas inflamatórias, incluindo caspase-1 ativa (Casp1p20), IL-1β e IL-18. A ativação do inflamassoma de NLRP3 pode ocorrer pela via canônica ou não canônica, quando há participação de caspase-4/CASP4 humana (caspase-11/CASP11 de camundongo). Objetivo: O objetivo deste trabalho foi investigar a ativação do inflamassoma e sua participação na fisiopatologia da COVID-19. Métodos e Resultados: Inicialmente, infectamos monócitos humanos primários in vitro com SARS-CoV-2 e avaliamos a ativação do inflamassoma. Observamos que a infecção por SARS-CoV-2 desencadeia a ativação da caspase-1, avaliada através do ensaio de luminescência, Caspase-Glo 1, e produção de IL-1β, quantificada por ELISA. Também observamos que o SARS-CoV-2 desencadeia a liberação de LDH em monócitos e requer a presença de SARS-CoV-2 viável. Em seguida, medimos a formação de "puncta" de NLRP3 e ASC e identificamos que o SARS-CoV-2 desencadeia a formação de "puncta" em um processo que também necessita de vírus viável. Posteriormente, infecções in vivo realizadas em camundongos transgênicos humanizados, K18-hACE2, deficientes ou não para CASP11, indicaram que camundongos hACE2 Casp11<sup>-/-</sup> foram protegidos guanto ao desenvolvimento da doença, com perda de peso corporal reduzida, variação de temperatura reduzida, área parenquimatosa pulmonar reduzida, escore clínico reduzido da doença e redução da mortalidade. Através do ensaio FAM-YVAD que permite a marcação de caspase-1 intracelular ativa, evidenciamos uma porcentagem maior de PBMCs FAM-YVAD+ em pacientes no dia zero de internação em comparação com os controles saudáveis. Além disso, a observação microscópica dessas células permitiu a visualização de "puncta" de NLRP3 e ASC em PBMCs, indicando que existem inflamassomas ativos em células de pacientes com COVID-19. Similarmente, encontramos o inflamassoma de NLRP3 ativo em tecidos de autópsia de pacientes *post mortem* através de ensaios de imuno-histoquímica e imunofluorescência. Vale salientar que os produtos derivados do inflamassoma, como Casp1p20 e IL-18 presentes nos soros dos pacientes, correlacionaram-se com os marcadores de gravidade de COVID-19,

incluindo IL-6 e LDH. Os níveis mais elevados de IL-18 e Casp1p20 foram associados à gravidade da doença e pior evolução clínica. Avaliando amostras de casos letais de COVID-19, também evidenciamos a expressão gênica aumentada de CASP4 por RT-PCR na nasofaringe e nos pulmões dos pacientes e esse resultado se correlacionou com a expressão de componentes do inflamassoma e mediadores inflamatórios, incluindo caspase-1 e IL-1β. Através do ensaio de western blotting, também observamos a ativação de CASP4 em PBMCs de pacientes com COVID-19 moderada e grave. **Conclusão:** Observamos que o SARS-CoV-2 induz a regulação positiva e a ativação da CASP4/CASP11 e esse processo contribui para a ativação do inflamassoma em resposta ao SARS-CoV-2. Nossos resultados sugerem que o inflamassomas participam da fisiopatologia da doença, indicando que essas plataformas podem ser um marcador de gravidade da doença e um potencial alvo terapêutico para COVID-19.

Apoio financeiro: FAPESP, CRID, CNPq e CAPES.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, COVID-19, inflamassoma, NLRP3, CASP4, CASP11

#### ABSTRACT

Introduction: Severe cases of COVID-19 are characterized by a strong inflammatory process that can lead to organ failure and patient death. The NLRP3 inflammasome is a molecular platform that promotes inflammation through the cleavage and activation of key inflammatory molecules, including active caspase-1 (Casp1p20), IL-1ß and IL-18. Activation of the NLRP3 inflammasome can occur via canonical or non-canonical pathways, when human caspase-4/CASP4 (mouse caspase-11/CASP11) is involved. Aim: The aim of this work was to investigate the activation of the inflammasome and its participation in the pathophysiology of COVID-19. Methods and Results: Initially, we infected primary human monocytes in vitro with SARS-CoV-2 and evaluated inflammasome activation. We observed that SARS-CoV-2 infection triggers caspase-1 activation, assessed through the luminescence assay, Caspase-Glo 1, and IL-1ß production, quantified by ELISA. We also observed that SARS-CoV-2 triggers LDH release in monocytes and requires the presence of viable SARS-CoV-2. We then measured NLRP3 and ASC "puncta" formation and identified that only the viable SARS-CoV-2 triggers "puncta" formation. Subsequently, in vivo infections performed in transgenic K18-hACE2 humanized mice, CASP11 deficient or not, indicated that hACE2 Casp11-/- mice were protected from the development of the disease, with reduced body weight loss, less temperature variation, diminished lung parenchymal area, lower clinical disease score, and reduced mortality. Through the FAM-YVAD assay, which allows the labeling of active intracellular caspase-1, we evidenced a higher percentage of FAM-YVAD+ PBMCs in patients on day zero of admission compared to healthy controls. Furthermore, microscopic observation of these cells allowed the visualization of puncta of NLRP3 and ASC in PBMCs, indicating that there are active inflammasomes in cells from patients with COVID-19. Studying moderate and severe COVID-19 patients, we performed immunohistochemistry and immunofluorescence assays and found active NLRP3 inflammasome in PBMCs and in postmortem autopsies of fatal patients. Of note, inflammasome-derived products such as Casp1p20 and IL-18 present in patient sera correlated with markers of COVID-19 severity, including IL-6 and LDH. Higher levels of IL-18 and Casp1p20 were associated with disease severity and worse clinical outcome. Evaluating samples from lethal COVID-19 cases, we also evidenced increased CASP4 gene expression by RT-

PCR in nasopharyngeal swabs and lungs of patients, and this result correlated with the expression of inflammasome components and inflammatory mediators, including caspase-1 and IL-1β. Through western blotting assay, we also observed CASP4 activation in PBMCs from patients with moderate and severe COVID-19. **Conclusion**: We observed that SARS-CoV-2 induces the upregulation and activation of CASP4/CASP11 and this process contributes to inflammasome activation in response to SARS-CoV-2. Our results suggest that inflammasomes participate in the pathophysiology of the disease, indicating that these platforms can be a marker of disease severity and a potential therapeutic target for COVID-19.

Financial support: FAPESP, CRID, CNPq and CAPES.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, inflammasome, NLRP3, CASP4, CASP11.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Coronavírus: visão geral	25
1.2. Coronavírus: SARS-CoV-2	29
1.3. COVID-19: dados epidemionógicos, transmissão,	diagnóstico,
manifestações clínicas e alteracoes laboratoriais	31
1.4. COVID-19: Imunopatogênese	33
1.5. COVID-19: Profilaxia e tratamento	
1.6. Inflamassomas	
	10
2. Objetivo Geral	
2.2. Objetivos Específicos	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Declarações Éticas	45
3.2. Pacientes	45
3.3. Isolamento de PBMCs	48
3.4. Macrófagos derivados da medula óssea	49
3.5 Produção de estoque viral	49
3.6. Infecção in vitro de monócitos humanos	49
3.7. Avaliação da atividade da caspase-1 ativa e liberação o	de LDH em
monócitos em cultura	50
3.8 RT-PCR para SARS-CoV-2	51

3.9. Western blotting e ensaio de "pull-down"para avaliação de CASP11 ativa em BMDMs
3.10. Avaliação da liberação de IL-1β e LDH em sobrenadantes de cultura de BMDMs
3.11. Avaliação da atividade da caspase-1 em PBMCs de pacientes com COVID-19
3.12. Coloração por imunofluorescência de células isoladas 53
3.13. Amostras de pulmão de autópsias 54
3.14. Imunofluorescência e imagem de amostras de pulmão de autópsias 54
3.15. Marcação e apagamento sequencial de imunoperoxidase 55
3.16. Quantificacao de citocinas em soros de pacientes 55
3.17 Dados de sequenciamento de RNA de swab nasofaríngeo de pacientes com COVID-19
3.18 Western blotting para CASP456
3.19 Extração de RNA e RT-PCR para genes inflamatórios 56
3.20 Animais e infecções in vivo 58
3.21 Quantificação da carga viral em amostras de pulmão de camundongos.59
3.22. Quantificação de citocinas e avaliação histológica em homogenatos pulmonares de camundongos
3.23. Análise estatística 60
4. RESULTADOS
4.1 A infecção por SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 em monócitos primários humanos
4.2 A CASP4 é expressa e ativa em monócitos humanos infectados com SARS- CoV-2
4.3. A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2

4.4. O SARS-CoV-2 induz a morte celular em macrófagos por diversas vias e pode ocorrer de maneira independente do inflamassoma
4.5. O IFN-I é capaz de regular negativamente a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2
4.6. A produção de IL-18 durante a infecção por SARS-CoV-2 é dependente da ativação não canônica via caspase-11 do inflamassoma de NLRP3
4.7. A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma de NLRP3 nos pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2
4.8 A CASP11 prejudica o "clearance" viral em camundongos infectados com SARS-CoV-2
4.9. A CASP11 medeia a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-2
4.10. O inflamassoma de NLRP3 está ativo em pacientes com COVID-19 86
4.11. A CASP4 é regulada positivamente e ativada em pacientes com COVID- 19
4.12. O inflamassoma de NLRP3 está ativo em tecidos <i>post mortem</i> de pacientes com COVID-19
4.13. A CASP4 é regulada positivamente nos pulmões de casos letais de COVID-19 e se correlaciona com mediadores inflamatórios e componentes do inflamassoma
4.14. A ativação do inflamassoma influencia no resultado clínico da COVID-
1995
5. DISCUSSÃO   102     6. SUMÁRIO   112     7. CONCLUSÃO   114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117
9. ANEXOS
9.1. Anexo 1: Premios e titulos
9.2. Anexo 2: Trabalhos de primeira autoria 131
9.3. Anexo 3: Trabalhos de co-autoria 131

9.4. Anexo 4: Repercussão desse trabalho no cenário nacional e internaciona

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV 25
Figura 2. Surgimento de SARS-CoV e MERS-CoV
Figura 3. Replicação de SARS-CoV e MERS-CoV
Figura 4. Estrutura do SARS-CoV-2 humano
Figura 5. Internalização do SARS-CoV-2
Figura 6. Patogênese da COVID-19
Figura 7. Inflamassomas
Figura 8. Ativação canônica e não canônica do inflamassoma de NLRP340
<b>Figura 9.</b> A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 e morte celular
Figura 10. A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 e morte celular
<b>Figura 11.</b> A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a expressão e ativação de caspase-4
<b>Figura 12.</b> A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2
<b>Figura 13.</b> A morte celular induzida por SARS-CoV-2 em macrófagos ocorre por diversas vias e pode ser independente do inflamassoma
<b>Figura 14.</b> IFN-I é capaz de regular negativamente a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-274
Figura 15. A produção de IL-18 durante a infecção por SARS-CoV-2 é dependente da ativação não canônica via caspase-11 do inflamassoma de NLRP375

<b>Figura 16.</b> A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em humanizados com ACE2 humanizada infectados com SARS-CoV-2
<b>Figura 17.</b> Produção de citocinas nos pulmões de camundongos após infecção com SARS-CoV-2
<b>Figura 18.</b> A CASP11 prejudica o <i>clearance</i> viral em camundongos infectados com SARS-CoV-2
<b>Figura 19.</b> CASP11 contribui para a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-282
<b>Figura 20.</b> A CASP11 agrava a patologia da doença, avaliada por análises histológicas de pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2
Figura 21. Produção de citocinas nos pulmões de camundongos 5 dias após a infecção com SARS-CoV-2
<b>Figura 22.</b> CASP11 e NLRP3 contribuem para a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-285
Figura 23. Ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-1987
Figura 24. Produção de citocinas em pacientes com COVID-1988
Figura 25. CASP4 é regulada positivamente em pacientes com COVID-1989
Figura 26. Análise histopatológica pulmonar e ativação de NLRP3 em casos fatais de COVID-1992
<b>Figura 27.</b> A CASP4 é regulada positivamente nos pulmões de casos letais de COVID- 19 e se correlaciona com mediadores inflamatórios e proteínas associadas ao inflamassoma

Figura 28. A expressão aumentada de CASP4 em tecidos pulmonares de autópsia de
pacientes com COVID-19 ocorre independentemente de co-infecções bacterianas e
fúngicas94
Figura 29. A ativação do inflamassoma influencia no resultado clínico da COVID- 19
Figura 30. Associação da ativação do inflamassoma com características clínicas e comorbidades
Figura 31. Participação do inflamassoma no desenvolvimento da COVID-19116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACE-2: Enzima Convertora de Angiotensina 2
- ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containg a CARD
- APC: Célula apresentadora de antígeno
- BMDMs: Macrófagos derivados de células da medula óssea
- CARD: Domínio de recrutamento de caspase
- CASP1: Caspase-1
- CASP4: Caspase-4
- CASP11: Caspase-11
- DAMPs: Padrões moleculares associados a danos
- DC: Célula dendrítica
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- E: Proteína do envelope
- IFN-γ: Interferon-gama
- IL: Interleucina
- K+: Íon potássio
- KCI: Cloreto de potássio
- LPG: Lipofosfoglicano
- LPS: Lipopolissacarídeo
- M: Membrana viral
- N: Proteína do nucleocapsídeo
- NaCI: Cloreto de sódio
- NAIP: Proteína inibidora de apoptose neuronal
- NF-ĸB: Fator nuclear ĸB
- NLR: Receptor do tipo NOD
- NLRP: NLR family, pyrin domain containing
- NLRP3: NLR family, pyrin domain containing 3
- NOD: Domínio de oligomerização nuclear
- NOS2: Óxido nítrico sintase 2
- NO: Óxido nítrico
- RNA: ácido ribonucleico
- S: Proteína Spike

Th: T "helper"

Th1: T "helper" tipo 1

Th2: T "helper" tipo 2

TLR: Receptor do tipo Toll

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TMPRSS: Serina Protease Transmembranar 2

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Salina tamponada com fosfato

PRRs: Receptores de reconhecimento padrão.

# Introdução

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1. 1 Coronavírus: visão geral

O nome coronavírus foi criado em 1968 devido a sua morfologia semelhante a uma coroa, do inglês "crown-like", observada por microscopia eletrônica (TYRRELL et al., 1975). Os coronavírus são os maiores vírus de RNA, com um genoma de 30 a 32 quilo bases, de fita com cadeia positiva e envelopados (PERLMAN; DANDEKAR, 2005a; WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005a). São membros da subfamília *Coronavirinae*, da família *Coronaviridae* e da ordem *Nidovirales* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus) (CUI; LI; SHI, 2019a).

O RNA do genoma é complexado com a proteína básica do nucleocapsídeo (N) para formar um capsídeo helicoidal encontrado dentro da membrana viral. As membranas de todos os coronavírus contêm pelo menos três proteínas virais. A proteína "spike" (S), uma glicoproteína do tipo I que forma espículas na superfície do vírion, dando ao vírus sua morfologia de coroa no microscópio eletrônico; a proteína de membrana (M), uma proteína que atravessa a membrana três vezes e possui um domínio N-terminal curto e uma cauda citoplasmática; e a proteína de membrana (E), uma proteína altamente hidrofóbica (ROBB; BOND; LEIBOWITZ, 1979; WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005b). O genoma dos coronavírus SARS-CoV-1 e MERS-CoV assim como as proteínas da partícula viral são demonstrados na **Fig. 1**. Além das proteínas já descritas, os coronavírus possuem proteínas acessórias que não estão envolvidas na replicação viral, mas interferem com a resposta imune inata ou possuem função desconhecida (DE WIT et al., 2016a).



**Figura 1. Estrutura dos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV.** Os genomas de RNA de fita simples (ssRNA) do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e do coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) codificam duas grandes poliproteínas, pp1a e pp1ab, que são clivados proteoliticamente em 16 proteínas não estruturais (nsps), incluindo protease

tipo papaína (PLpro), protease tipo 3C (3CLpro), polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), helicase (Hel) e exonuclease (ExoN). Um adicional de 9-12 ORFs são codificados através da transcrição de um conjunto aninhado de RNAs subgenômicos. SARS-CoV e MERS-CoV formam partículas esféricas que consistem em quatro proteínas estruturais. A glicoproteína "spike" do envelope (S) forma uma camada de glicoproteínas que se projetam do envelope. Duas glicoproteínas transmembrana adicionais são incorporadas no virion: envelope (E) e membrana (M). Dentro do envelope viral reside o nucleocapsídeo helicoidal, que consiste no genoma do RNA viral de sentido positivo ((+)RNA) encapsulado pelo nucleocapsídeo proteico (N). *Adaptada de de Wit et al 2016.* 

Existem quatro gêneros de coronavírus: alfa, beta, gama e delta (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005a). Os alfa coronavírus e beta coronavírus infectam apenas mamíferos. Por outro lado, os gama e delta coronavírus infectam pássaros, mas eventualmente infectam mamíferos (WOO et al., 2012). Os coronavírus podem causar bronquite infecciosa em pássaros, falência de múltiplos órgãos em felinos e enterites em porcos, vacas e cachorros. Em humanos, podem causar principalmente uma doença respiratória e, em menor frequência, gastroenterites (PERLMAN; DANDEKAR, 2005a).

Os coronavírus OC43 (HCoV-OC43) e HCoV-229E infectam humanos e causam febre, enquanto os mais recentemente identificados, HCoV-HKU1 e HCoV-NL63, causam uma doença respiratória mais grave, porém não fatal (FOUCHIER et al., 2004; PERLMAN; DANDEKAR, 2005b).

Nas duas últimas décadas, três beta coronavírus altamente patogênicos emergiram a partir de eventos zoonóticos: SARS-CoV-1, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (AMANAT; KRAMMER, 2020). O coronavírus 1 causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1) emergiu nos anos de 2002 e 2003 na China e se espalhou ao redor do mundo, infectando mais de 8000 pessoas, com uma taxa de mortalidade de 10%. Cerca de 10 anos depois, houve o surgimento do coronavírus relacionado a síndrome respiratória no Oriente Médio (MERS-CoV) que infectou cerca de 2500 pessoas com uma taxa de mortalidade de 36% desde 2012 (DE WIT et al., 2016a).

Os principais reservatórios de SARS-CoV-1 e MERS-CoV são os morcegos(CUI; LI; SHI, 2019b). Anticorpos para o SARS-CoV-1 também foram encontrados em civetas e outros animais vendidos em mercados de animais vivos na China (DE WIT et al., 2016a; GUAN et al., 2003). Entretanto, esses animais foram apenas incidentalmente infectados (DE WIT et al., 2016a). Similarmente, dromedários possuíram anticorpos para o MERS-CoV, indicando que podem ser possíveis hospedeiros intermediários para transmissão zoonótica para humanos (DE WIT et al., 2016b; REUSKEN et al., 2013) (**Figura 2**).



**Figura 2. Surgimento de SARS-CoV e MERS-CoV.** Os morcegos abrigam uma ampla variedade de coronavírus, incluindo vírus semelhantes ao coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e vírus semelhantes ao coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). O SARS-CoV atravessou a barreira das espécies em civetas de palmeira mascarados e outros animais mercados de animais vivos na China; a análise genética sugere que isso ocorreu no final de 2002. Várias pessoas próximas a civetas de palma foram infectadas com SARS-CoV. Um vírus ancestral MERS-CoV cruzou a barreira das espécies em camelos dromedários; evidências sorológicas sugerem que isso aconteceu há mais de 30 anos. A circulação abundante de MERS-CoV em camelos dromedários resulta em transmissão zoonótica frequente desse vírus. O SARS-CoV e o MERS-CoV se espalham entre humanos principalmente por transmissão nosocomial, o que resulta na infecção de profissionais de saúde e pacientes com maior frequência do que a infecção de seus parentes. *Adaptada de de Wit et al 2016.* 

O SARS-CoV-1 utiliza a enzima convertora de angiotensina-2 (ECA) como um receptor para entrar principalmente em células epiteliais brônquicas e em pneumócitos do tipo II (LI et al., 2003; QIAN et al., 2013), enquanto o MERS-CoV usa a dipeptidil peptidase 4 (DPP4, também chamada de CD26) como um receptor para infectar as células epiteliais brônquicas não ciliadas e os pneumócitos do tipo II (LU et al., 2013; RAJ et al., 2013; SCOBEY et al., 2013).

Após a entrada via fusão direta com a membrana plasmática da célula hospedeira ou através de endossomos, o genoma do RNA viral é liberado no citoplasma, tornase disponível para ser traduzido em duas poliproteínas. Em seguida, ocorre a transcrição dos RNAs subgenômicos e a replicação do genoma viral (**Figura 3**). As glicoproteínas recém-formadas do envelope viral são inseridas nas membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER) ou Golgi. No compartimento intermediário ER- Golgi (ERGIC), o RNA genômico se combina com as proteínas do nucleocapsídeo e com o envelope viral, dando origem as partículas virais. Por fim, as vesículas contendo vírions se fundem com a membrana plasmática para liberar o vírus (DE WIT et al., 2016b).



**Figura 3. Replicação de SARS-CoV e MERS-CoV.** Após a entrada do vírus na célula hospedeira, o RNA viral não é revestido no citoplasma. ORF1a e ORF1ab são traduzidos para produzir pp1a e pp1ab, que são clivados pelas proteases que são codificadas por ORF1a para produzir 16 nsps que formam o complexo RNA replicase-transcriptase. Esse complexo localiza-se em membranas intracelulares modificadas que são derivadas do retículo endoplasmático rugoso (ER) na região perinuclear e conduz a produção de RNAs de sentido negativo ((–) RNAs) por meio de replicação e transcrição. Durante a replicação, cópias de (-) RNA de comprimento total do genoma são produzidas e usadas como modelos para genomas de (+) RNA de comprimento total. Durante a transcrição, um subconjunto de 7 a 9 RNAs subgenômicos, incluindo aqueles que codificam todas as proteínas estruturais, é produzido por meio de transcrição descontínua. Nesse processo, os (-) RNAs subgenômicos são sintetizados combinando comprimentos variados da extremidade 3' do genoma com a sequência líder 5' necessária para a tradução. Esses (-) RNAs subgenômicos são então transcritos em (+) mRNAs subgenômicos. Embora os diferentes mRNAs subgenômicos possam conter várias ORFs, apenas a primeira ORF (a que está

mais próxima da extremidade 5') é traduzida. As proteínas estruturais resultantes são montadas no nucleocapsídeo e no envelope viral no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC), seguido pela liberação do virion nascente da célula infectada. *Adaptada de de Wit et al 2016.* 

Desde meados de 2005 estudos já demonstravam que a patogênese do SARS-CoV-1 seria imunomediada. Animais infectados com coronavírus demonstraram uma resposta excessiva e desregulada de macrófagos e outras células inflamatórias (PERLMAN; DANDEKAR, 2005a). Tal desregulação da resposta imune ocorre nos hospedeiros infectados com os coronavírus murino (MHV), felino (FIPV) e o SARS-CoV-1 em humanos (PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004; PERLMAN; DANDEKAR, 2005a).

A resposta imune descompensada pode ocorrer de três formas. Primeiro, quando a infecção viral resulta numa resposta inflamatória intensa e compromete as funções fisiológicas e pode resultar numa destruição tecidual excessiva. Nessa situação, a infecção viral compromete os mecanismos de "feedback" normais responsáveis pelo controle da inflamação, levando a uma resposta exacerbada, com alta produção de citocinas e quimiocinas, fenômeno que é denominado como tempestade de citocinas. Segundo, quando a infecção direta em células imunes causa a desregulação de mediadores imunes produzidos por essas células. Terceiro, quando a resposta imune adaptativa passa a se direcionar para o próprio hospedeiro, gerando reações autoimunes (PERLMAN; DANDEKAR, 2005a).

Várias características comuns a animais infectados com FIPV ou MHV e a pacientes infectados com SARS-CoV-1 são consistentes com a caracterização da doença como sendo imunomediada, com uma maior propensão do vírus para infectar macrófagos e células dendríticas (DCs), induzindo concentrações sistêmicas aumentadas de quimiocinas e outras citocinas inflamatórias (PERLMAN; DANDEKAR, 2005a).

Além dos coronavírus já citados, em 2019, houve o surgimento do Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), que é o agente causador da doença de coronavírus que surgiu em 2019, denominada COVID-19.

#### 1.2. Coronavírus: SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 tem um diâmetro de 60 nm a 140 nm e "spikes" que variam de 9 nm a 12 nm, dando aos vírions a aparência de uma coroa solar (GOLDSMITH et al., 2004).



**Figura 4. Estrutura do SARS-CoV-2 humano**. **A)** Elementos estruturais do vírus, incluindo a proteína "spike" (S), envelope (E), membrana (M) e componentes internos, como o RNA de fita simples viral e as proteínas do nucleocapsídeo. **B)** Componentes do genoma SARS-CoV-2. *Figura adaptada de Jamison et al., 2022.* 

Por meio de recombinação genética e variação, os coronavírus podem se adaptar e infectar novos hospedeiros. Acredita-se que os morcegos sejam o reservatório natural para SARS-CoV-2, mas foi sugerido que os humanos foram infectados com SARS-CoV-2 por meio de um hospedeiro intermediário, como o pangolim (LAM et al., 2020; LU et al., 2020a).

O SARS-CoV-2 compartilha 73% de homologia com o SARS-CoV-1(MERAD et al., [s.d.]). A entrada do SARS-COV-2 em células hospedeiras ocorre de forma dependente de ACE-2, de modo semelhante ao SARS-CoV-1. Para que isso ocorra, a proteína S se liga ao receptor ACE-2 através da sua subunidade S1 levando a clivagem proteolítica da proteína S pela serina protease TMPRSS e fusão da subunidade S2 com a membrada da célula do hospedeiro (CHEN et al., 2020c; HOFFMANN et al., 2020).



**Figura 5. Internalização do SARS-CoV-2.** Interações estruturais entre o vírus e a célula-alvo, incluindo a proteína de pico viral, receptor ACE2, reação TMPRSS2 para clivar e iniciar a internalização intracelular viral. *Figura adaptada de Jamison et al., 2022.* 

Em um estudo comparativo entre o genoma de SARS-CoV-2 com SARS-CoV-1 e vírus SARS-like de morcegos e outros hospedeiros intermediários, foi descrito que existem ORFs 7b, 9b e 9c sobrepostas em todos os genomas. Por outro lado, a ORF3b não se mostrou funcional em todos os genomas. Também foram previstas novas ORFs putativas, incluindo uma forma truncada da ORF10 previamente identificada no SARS-CoV-2 e uma ORF pouco conhecida que se sobrepõe à proteína S em Civet-CoV e SARS-CoV (MICHEL et al., 2020).

## 1.3. COVID-19: dados epidemiológicos, transmissão, diagnóstico, manifestações clínicas e alterações laboratoriais

A COVID-19 é uma doença inflamatória causada pelo SARS-CoV-2, que pode se manifestar como um amplo espectro de sintomas que variam de poucos ou nenhum sintoma a pneumonia grave que pode evoluir para síndrome do desconforto respiratório agudo e morte (MERAD; MARTIN, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença já acumulou mais de meio bilhão de casos e 6,5 milhões de mortes ao redor do mundo (OMS, 2022).

O SARS-CoV-2 é disseminado principalmente por gotículas respiratórias durante um contato pessoal próximo (WIERSINGA et al., 2020a). A infecção pode ser transmitida por portadores assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos. O tempo médio de incubação entre a exposição ao início dos sintomas é de 5 dias (2 a 7 dias)

(CHEN et al., 2020a; LAUER et al., 2020), e 97,5% das pessoas que desenvolvem sintomas o fazem dentro de 11 dias (LAUER et al., 2020).

O diagnóstico é feito pela detecção de SARS-CoV-2 por meio de teste de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa, que tem como fatores importantes a técnica de coleta adequada, tempo de exposição e a fonte da amostra afim de evitar falso-negativos (WIERSINGA et al., 2020a).

Embora o ácido nucleico viral possa ser detectável em amostra de swab de garganta por até 6 semanas após o início da doença, culturas virais são geralmente negativas para SARS-CoV-2 8 dias após o início dos sintomas (HE et al., 2020; SUN et al., 2020; WÖLFEL et al., 2020). Isso é suportado por estudos epidemiológicos que mostraram que a transmissão não ocorreu para contatos cuja exposição começou mais de 5 dias após o início dos sintomas (WIERSINGA et al., 2020b), sugerindo que os indivíduos podem ser liberados do isolamento com base em melhora clínica. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças recomendam o isolamento por pelo menos 10 dias após o início dos sintomas e 3 dias após a melhora dos sintomas (WIERSINGA et al., 2020b).

Os sintomas mais comuns são febre, tosse seca e falta de ar (Wiersinga et al., 2020) enquanto que sintomas menos frequentes são dor muscular, confusão, cefaleia, dor de garganta, rinorreia, dor torácica, diarreia, náuseas e vômitos (CHEN et al., 2020d).

As manifestações de COVID-19 incluem indivíduos assintomáticos e doença fulminante caracterizada insuficiência por sepse е respiratória aguda. Aproximadamente 5% dos pacientes com COVID-19 e 20% dos hospitalizados apresentam sintomas graves que requerem cuidados intensivos. Mais de 75% dos hospitalizados com COVID-19 requerem oxigênio suplementar pacientes (ALHAZZANI et al., 2020).

Na COVID-19 grave, ocorre ativação fulminante da coagulação e consumo de fatores de coagulação (TANG et al., 2020; THACHIL et al., 2020). Um relatório de Wuhan, China, indicou que 71% dos 183 indivíduos que morreram de COVID-19 preenchiam os critérios para coagulação intravascular difusa (TANG et al., 2020).

A taxa de letalidade do COVID-19 varia acentuadamente de acordo com a idade, variando de 0,3 mortes por 1.000 casos entre pacientes de 5 a 17 anos a 304,9 mortes por 1.000 casos entre pacientes com 85 anos ou mais nos EUA. Entre os

pacientes internados na unidade de terapia intensiva, a letalidade chega a 40% (WIERSINGA et al., 2020a).

A infecção por SARS-CoV-2 tem maior probabilidade de afetar homens mais velhos com comorbidades e pode resultar em doenças respiratórias graves e até fatais, como síndrome do desconforto respiratório agudo (CHEN et al., 2020c). Isso pode ser explicado devido a uma maior produção de citocinas como a IL-6, quimiocinas, ferritina e LDH em pacientes do sexo masculino infectados por SARS-CoV-2 do que em pacientes do sexo feminino (CHI et al., 2020a; ZENG et al., 2020).

Vários estudos têm demonstrado a associação clínica de mediadores inflamatórios como proteína C reativa (PCR), dímero D, ferritina e lactato desidrogenase (LDH), com casos graves, sugerindo que a inflamação excessiva é central para um desfecho clínico ruim (HAN et al., 2020; HUANG et al., 2020a; WU et al., 2020).

Sabe-se que a enzima LDH está presente em todas as células humanas, incluindo células do miocárdio e do fígado e é associada com morte celular lítica (LEGRAND et al., 1992). Um estudo recente com pacientes demonstrou pacientes com níveis elevados de LDH se correlaciona com maior escore clínico e, portanto, com a gravidade da COVID-19. Além disso, a enzima LDH também se correlaciona com enzimas hepáticas elevadas, tais como AST, troponina I e peptídeo natriurético nesses pacientes. Dessa forma, esses estudos sugerem que a enzima LDH seja um biomarcador para o reconhecimento precoce de lesão tecidual em pacientes graves (HAN et al., 2020; WU et al., 2020; ZENG et al., 2020).

O aumento significativo das citocinas IL-6, IL-7, IL-10, IL-18, G-CSF, M-CSF, MCP-1, MCP-3, IP-10, MIG e MIP-1α também foi associado à gravidade da COVID-19. Curiosamente, a indução destas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por SARS-CoV-2 foi observada não apenas em pacientes sintomáticos, mas também em casos assintomáticos, e os níveis dessas citocinas voltaram ao normal após a recuperação (CHEN et al., 2020a; CHI et al., 2020b; HUANG et al., 2020a).

#### 1.4. COVID-19: Imunopatogênese

O SARS-CoV-2 possui patogênese similar ao SARS-CoV-1, caracterizada por duas fases (CHANNAPPANAVAR et al., 2016). A primeira fase é representada pela replicação viral resultante do dano tecidual mediado pelo vírus. O grau do dano determina a patogênese da segunda fase que é caracterizada pelo recrutamento de células imunes causando uma resposta inflamatória sistêmica e local que persiste mesmo após o *clearance* viral (HAN et al., 2020; HUANG et al., 2020a; WU et al., 2020).

Existem duas hipóteses que explicam a fisiopatologia da COVID-19 grave: as inabilidades de montar uma resposta antiviral eficaz e a inabilidade de controlar a resposta inflamatória (**Fig. 4**)

Alguns mecanismos de indução de inflamação pelo SARS-CoV-2 têm sido investigados. Inicialmente, foi identificado que pacientes diagnosticados com COVID-19 grave possuem níveis de TLR2 elevados juntamente com um aumento da expressão gênica das proteínas adaptadoras MYD88 e TRIF em comparação com pacientes saudáveis (HADJADJ et al., 2020; ZHENG et al., 2021) Khan e colaboradores demonstraram que o reconhecimento da proteína S viral ocorre via TLR2 que dimeriza com TLR1 e TLR6 para ativar MyD88 e, em seguida, NF-κB, levando a transcrição de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1β, TNF, CXCL1, CXCL2, CCL2 em macrófagos. No entanto, esse reconhecimento via TLR2 não induz a transcrição de IFN-I (KHAN et al., 2021; ZHENG et al., 2021).

Outros PRRs citosólicos reconhecem proteínas do SARS-CoV-2, incluindo o RIG-I, MDA-5 e LGP2, que medeiam o reconhecimento de RNA viral em células epiteliais pulmonares infectadas e iniciam a defesa antiviral de linha de frente por meio de mecanismos dependentes e independentes de IFN-I (YAMADA et al., 2021; YIN et al., 2021).

A produção de IFN tipo I pelas células hospedeiras é crítica para limitar a replicação viral e promover a imunidade antiviral (MERAD et al., [s.d.]). Em comparação com outros vírus respiratórios, a infecção por SARS-CoV-2 gera a uma resposta transcricional antiviral mais baixa, caracterizada por baixos níveis de IFN-I e IFN-III e expressão elevada de quimiocinas que recrutam células efetoras, o que poderia explicar o estado pró-inflamatório da COVID-19 (BLANCO-MELO et al., 2020). Variantes de perda de função em "loci" que controlam a produção de IFN tipo I dependente de TLR3 e IRF7 foram identificadas em um número pequeno de pacientes graves (ZHANG et al., 2020). Autoanticorpos contra IFN- $\alpha$  e IFN- $\omega$  (BASTARD et al., 2020; CHANG et al., 2021; WANG et al., 2021) foram identificados em pacientes com doença grave e demonstraram contribuir para a eliminação viral atrasada(WANG et
al., 2021). Descobriu-se recentemente que os autoanticorpos neutralizantes para IFN- $\alpha$  e IFN- $\omega$  aumentam com a idade (BASTARD et al., 2020), sugerindo que os autoanticorpos de IFN tipo I podem preceder a doença e servir como um biomarcador da gravidade da doença (MERAD et al., [s.d.])

Autopsias de pacientes com COVID-19 demonstraram que existe uma baixa infecção viral ativa e um acúmulo considerável de células imunes, sugerindo que a falência de órgãos não seja provavelmente resultante de um dano tecidual induzido pela replicação viral, mas seja causado por uma ativação exacerbada do sistema imune e dano vascular. Logo, as complicações em casos graves a críticos de COVID-19 são frequentemente imunomediadas, e não causadas pela própria replicação viral (MERAD et al., [s.d.]).

Além do problema da persistência viral por fatores descritos acima, existe a incapacidade de conter resposta inflamatória exacerbada na COVID-19 (**Figura 4**).

Um estudo de transcriptoma de pacientes com COVID-19 revelou que houve um predomínio de monócitos inflamatórios produtores de IL1β em comparação com os controles saudáveis (WEN et al., 2020). Corroborando com esse achado, outro estudo evidenciou um excesso de monócitos imaturos circulantes, neutrófilos e progenitores mieloides durante a primeira fase da infecção em pacientes graves, provavelmente devido ao atraso na depuração viral (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020). As células mieloides circulantes produzem quantidades excessivas de moléculas inflamatórias que promovem aumento da permeabilidade vascular e dano tecidual. Por outro lado, os macrófagos residentes no tecido pulmonar que desempenham um papel fundamental na homeostase e reparo do tecido chegam à exaustão em pacientes graves (DELOREY et al., 2021; LIAO et al., 2020).

Enquanto há um aumento de células mieloides, especialmente monócitos, em pacientes com COVID-19, a infecção por SARS-CoV-2 pode causar linfopenia, afetando principalmente as células T CD4+ (WEN et al., 2020) e CD8+, resultando na redução da produção de IFN-γ por células TCD4+ (CHEN et al., 2020a).

A redução do número de DCs e linfopenia profunda de células T impulsionada pelo recrutamento de células T para os tecidos ou apoptose dessas células como resultado do excesso de citocinas pró-inflamatórias é comum em pacientes graves (MATHEW et al., 2020; ZHOU et al., 2020) e pode contribuir à depuração viral deficiente mediada por células T defeituosas. Foi demonstrado que defeitos nas respostas imunes tipo 1(MATHEW et al., 2020) e excesso de imunidade tipo 2 se

correlacionam com COVID-19 grave (LUCAS et al., 2020), sugerindo que uma resposta imune adaptativa mal orquestrada contra o vírus também pode levar ao atraso na eliminação viral e progressão da doença (MERAD et al., [s.d.]).

A expansão substancial dos plasmablastos atingindo até 30% das células B circulantes também foi relatada em pacientes graves (KANEKO et al., 2020).

Autoanticorpos patogênicos foram identificados na COVID-19 grave, incluindo autoanticorpos anti-fosfolipídeos, causando coágulos em modelos murinos (ZUO et al., 2020). Além disso, foi observado que a fagocitose celular dependente de anticorpo está aumentada em pacientes devido aos autoanticorpos anti-CD38 ou anti-CD3, contribuindo para a linfopenia profunda observada em alguns pacientes (WANG et al., 2021). Autoanticorpos também foram observados no fluido cerebrospinal de pacientes com sintomas neurológicos (FRANKE et al., 2021).

A hipercoagulação, danos endoteliais e embolia arterial e venosa são muito comuns na COVID-19 grave (LIVANOS et al., 2021). Embora os mecanismos exatos da hipercoagulação não estejam esclarecidos, acredita-se que pode ser resultado de danos virais diretos à vasculatura ou respostas inflamatórias graves, que podem alterar o endotélio vascular e induzir a ativação de plaquetas, monócitos e macrófagos que, por sua vez, promovem a liberação de fator tecidual, fator de von Willebrand e fator VIII, levando à produção de trombina e formação de coágulos de fibrina (PERICO et al., 2021).



Figura 6. Patogênese da COVID-19. A incapacidade de montar uma resposta antiviral oportuna e eficaz devido à resposta retardada do IFN-I, função alterada de apresentação do antígeno ou macrófagos residentes no tecido encontram-se alterados, o que é comum em indivíduos mais velhos, promove a persistência viral e o dano tecidual prolongado que desencadeia uma permeabilidade vascular prolongada com recrutamento de células mieloides para o local da infecção. O aumento da

mielopoese e o dano vascular comum em indivíduos mais velhos e em pacientes com doenças inflamatórias crônicas contribuem ainda mais para o aumento da liberação de células mielóides inflamatórias da medula óssea para a circulação sanguínea e seu recrutamento para o local da infecção, levando a danos teciduais profundos, lesões vasculares e coágulos sanguíneos comuns em pacientes com doença grave.

#### 1.5. COVID-19: Profilaxia e Tratamento

As seguintes classes de medicamentos estão sendo avaliadas ou desenvolvidas para o manejo da COVID-19: antivirais (por exemplo, remdesivir, favipiravir), anticorpos (por exemplo, plasma convalescente, imunoglobulinas hiperimunes), agentes anti-inflamatórios (dexametasona, estatinas), terapias imunomoduladoras direcionadas (por exemplo, tocilizumabe, sarilumabe, anakinra, ruxolitinibe), anticoagulantes (por exemplo, heparina) e anti-fibróticos (por exemplo, inibidores de tirosina quinase). É provável que diferentes modalidades de tratamento possam ter diferentes eficácias em diferentes estágios da doença e em diferentes manifestações da doença. Espera-se que a inibição viral seja mais eficaz no início da infecção, enquanto, em pacientes hospitalizados, agentes imunomoduladores podem ser úteis para prevenir a progressão da doença e anticoagulantes podem ser úteis para prevenir complicações tromboembólicas (WIERSINGA et al., 2020).

Dados emergentes indicam que a terapia com dexametasona reduz a mortalidade em 28 dias em pacientes que necessitam de oxigênio suplementar em comparação com os cuidados usuais (21,6% vs 24,6%; razão de taxa ajustada à idade, 0,83 [IC 95%, 0,74-0,92]) e que o remdesivir melhora o tempo para recuperação (alta hospitalar ou sem necessidade de oxigênio suplementar) de 15 a 11 dias (WIERSINGA et al., 2020a).

Em um estudo randomizado de 103 pacientes com COVID-19, o plasma convalescente não reduziu o tempo de recuperação (LI et al., 2020a). A profilaxia tromboembólica com heparina subcutânea de baixo peso molecular é recomendada para todos os pacientes hospitalizados com COVID-19 (LEVI et al., 2020). Estudos estão em andamento para avaliar se certos pacientes (ou seja, aqueles com dímero D elevado) se beneficiam da anticoagulação terapêutica (WIERSINGA et al., 2020a).

Vale ressaltar que os ensaios clínicos em andamento visam a inibição da sinalização do inflamassoma e da IL-1 usando diferentes drogas, incluindo Anakinra (CAVALLI et al., 2021; HUET et al., 2020).

Uma característica marcante do cenário de desenvolvimento de vacinas para COVID-19 é a variedade de plataformas tecnológicas que tem sido avaliadas, incluindo ácido nucleico (DNA e RNA), partícula semelhante a vírus, peptídeo, vetor viral (replicante e não replicante), proteínas recombinantes, vírus vivos atenuados e abordagens de vírus inativados. as novas plataformas baseadas em DNA ou mRNA oferecem grande flexibilidade em termos de manipulação de antígenos e potencial de velocidade. As vacinas baseadas em vetores virais oferecem um alto nível de expressão de proteínas e estabilidade a longo prazo, além de induzir fortes respostas imunes. Por fim, já existem vacinas licenciadas à base de proteínas recombinantes para outras doenças e, portanto, tais candidatas poderiam aproveitar a capacidade de produção em larga escala existente. Para algumas plataformas, os adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade e viabilizar doses mais baixas, permitindo assim a vacinação de mais pessoas sem comprometer a proteção (Le et al., 2020).

#### **1.6. INFLAMASSOMAS**

A indução de processos inflamatórios na célula hospedeira muitas vezes requer o envolvimento de inflamassomas, que são plataformas de proteínas que se agregam no citosol em resposta a diferentes estímulos (BROZ; DIXIT, 2016a). A ativação do inflamassoma ocorre por meio de dois sinais (**Figura 8**). O primeiro sinal ocorre quando há engajamento de um PRR que reconhece determinado PAMP ou através da sinalização de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-6. O segundo sinal pode ocorrer em resposta a sinais de dano como efluxo de potássio (K+), dano lisossomal e ROS (SWANSON; DENG; TING, 2019; TSCHOPP; SCHRODER, 2010).

Os inflamassomas são formados por pelo menos 3 componentes: a caspase inflamatória, CASP1, uma molécula adaptadora ASC (proteína "speck-like" associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspase), e uma proteína que age como sensor/receptor (NLRP1, NLRP12, NLRP3, NAIP1, NAIP2, NAIP5 ou AIM2) (**Figura 7**). Esse sensor determinará a especificidade do inflamassoma, podendo ser ativadas frente a produtos microbianos ou a sinais de estresse celular. A ativação do sensor através do reconhecimento do seu agonista específico leva a sua oligomerização que permite o recrutamento da molécula adaptadora (ASC) e CASP1. A CASP1 é ativada por clivagem proteolítica e promove a ativação de substratos, incluindo as citocinas

inflamatórias IL-1β e IL-18 e gasdermina-D (GSMD), uma proteína formadora de poros que induz uma forma inflamatória de morte celular chamada piroptose (BROZ; DIXIT, 2016b).



**Figura 7. Inflamassomas.** Os inflamassomas canônicos contêm sensores pertencentes à família NLR ou ALR. O NLRP3 é ativado por uma ampla variedade de sinais, incluindo citotoxinas formadoras de poros, ATP, ácido úrico e alúmen. NLRC4 é ativado por flagelina bacteriana e componentes T3SS, NLRP1b é ativado por toxina letal do antraz e AIM2 é ativado por dsDNA citosólico. Uma vez ativados, os receptores formam um complexo de inflamassoma com ou sem molécula adaptadora, ASC, e recrutam procaspase-1, que é subsequentemente clivada em caspase-1 ativa. A caspase-1 cliva as pró-formas de IL-1β e IL-18 em suas formas ativas, bem como induz a morte celular. Abreviaturas: AIM2, ausente no melanoma 2; ALR, receptor do tipo AIM2; ASC, proteína "speck like"associada à apoptose contendo um CARD; IL, interleucina; NLR, domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) e família contendo repetição rica em leucina (LRR); T3SS, sistema de secreção tipo III.

O inflamassoma de NLRP3 é o mais estudado dessas plataformas e compreende o receptor NLRP, ASC e CASP1 (BROZ; DIXIT, 2016b). A ativação de NLRP3 em resposta a infecções microbianas, danos celulares ou agregados no citoplasma da célula hospedeira promove a polimerização de ASC, levando à formação de uma estrutura microscópica chamada "puncta" ou "speck" que é uma marca registrada de inflamassomas ativos nas células (HAUENSTEIN; ZHANG; WU, 2015).

A ativação canônica do inflamassoma NLRP3 ocorre em resposta a moléculas que induzem diretamente a formação de poros ou danificam as membranas, permitindo o efluxo da ativação do NLRP3 mediada por K+ (BROZ; DIXIT, 2016a; HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; RÜHL; BROZ, 2015; SHI; GAO; SHAO, 2017). Por outro lado, a ativação da Caspase-4/CASP4 humana (caspase-11/CASP11 de camundongo) leva à ativação não canônica de NLRP3, um processo que requer uma molécula formadora de poros intracelular para promover a liberação de K+ e permitir a ativação de NLRP3 (BAKER et al., 2015; RÜHL; BROZ, 2015; SCHMID-BURGK et al., 2015) (**Figura 8**). Moléculas que desencadeiam a ativação de CASP4/11 no citoplasma de células de mamíferos incluem lipopolissacarídeos bacterianos, lipofosfoglicanos de parasitas e moléculas endógenas, como fosfolipídios oxidados(DE CARVALHO et al., 2019; HAGAR et al., 2013; KAYAGAKI et al., 2011; ZANONI et al., 2016). Apesar da importância da piroptose na imunidade antiviral (KURIAKOSE; KANNEGANTI, [s.d.]), o papel do CASP4/11 nas infecções virais permanece pouco compreendido.



**Figura 8. Ativação canônica e não canônica do inflamassoma de NLRP3.** O 1º sinal ("priming"; esquerda) é fornecido pela ativação de citocinas ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), levando à regulação positiva da transcrição de NLRP3, pró-IL-1β e a pró-IL-18. O 2º sinal (ativação; direita) é fornecido por qualquer um dos numerosos PAMPs ou padrões moleculares

associados a danos (DAMPs), como partículas, cristais e ATP, que ativam vários eventos de sinalização. Estes incluem efluxo de K<sup>+</sup>, fluxo de Ca<sup>2+</sup>, ruptura lisossômica, produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS), relocalização de cardiolipina para a membrana mitocondrial externa e liberação de DNA mitocondrial oxidado (Ox-mtDNA), seguido de efluxo de Cl<sup>-</sup>. Quando há ativação da caspase-4 (em humanos) ou caspase-11 (em camundongos) também há formação de poro, com efluxo de K+ e ativação não canônica de NLRP3. A formação do inflamassoma ativa a caspase-1, que por sua vez cliva a pró-IL-1 $\beta$  e a pró-IL-18. A gasdermina D (GSDMD) também é clivada e se insere na membrana, formando poros e induzindo piroptose CARD, domínio de recrutamento de caspases; GSDMD, gasdermina D; HK, LRR, repetição rica em leucina; ROS, espécies reativas de oxigênio; K<sup>+</sup>, potássio.

# Objetivos

#### 2. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ativação do inflamassoma na infecção por SARS-CoV-2 e a sua participação no desenvolvimento da COVID-19 grave.

#### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar a ativação do inflamassoma em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 *in vitro*.

2.2.2. Avaliar a participação da CASP4/CASP11 na ativação do inflamassoma em monócitos humanos e macrófagos murinos infectados com SARS-CoV-2 *in vitro*.

2.2.3. Identificar se a morte celular por piroptose ocorre em monócitos humanos e macrófagos murinos resposta a infecção pelo SARS-CoV-2.

2.2.4 Avaliar as possíveis vias de regulação da ativação do inflamassoma em macrófagos murinos infectados *in vitro*.

2.2.5. Investigar a importância da CASP11 para a ativação do inflamassoma de NLRP3 em animais *Casp11*<sup>+/+</sup>, *Casp11*<sup>+/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup> infectados com SARS-CoV-2 *in vivo*.

2.2.6. Avaliar a participação da CASP11 na fisiopatologia e no desenvolvimento da doença em animais *Casp11*<sup>+/+</sup>, *Casp11*<sup>+/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup> infectados com SARS-CoV-2 *in vivo*.

2.2.7. Investigar a expressão de componentes do inflamassoma e sua ativação em amostras de nasofaringe, tecido pulmonar e em células mononucleares periféricas do sangue de pacientes com COVID-19.

2.2.8. Avaliar os produtos da ativação do inflamassoma no sangue de pacientes leves, moderados e graves a fim de correlacioná-los com a magnitude da doença.

# Material e Métodos

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1. Declarações Éticas

Todos os experimentos realizados com amostras humanas e com animais foram aprovados pelo comitê de ética institucional. Isso inclui experimentos com amostras de sangue humano (Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto - USP: CAAE, nº 06825018.2.3001.5440) e experimentos com autópsias pulmonares (Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP/USP sob protocolo nº 4.089.567). Todos os experimentos com camundongos foram conduzidos de acordo com as diretrizes dos comitês de ética institucional para cuidados com animais da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP (Protocolo aprovado número 133/2020).

#### 3.2. Pacientes

Um total de 124 pacientes com COVID-19 que testaram positivo usando RT-PCR conforme descrito anteriormente (CORMAN et al., 2020; NALLA et al., 2020) foram incluídos neste estudo. Os pacientes foram classificados de acordo com suas manifestações clínicas em (1) casos leves, nos guais os sintomas clínicos são leves e não há manifestação de pneumonia nos exames de imagem; (2) casos moderados, nos quais os pacientes apresentam sintomas como febre e sintomas do trato respiratório e manifestações de pneumonia identificáveis em exames de imagem; e (3) casos graves, significando adultos que preencheram qualquer um dos seguintes critérios: frequência respiratória >30 respirações/min, saturações de oxigênio de 93% em estado de repouso e pressão parcial arterial de oxigênio (PaO2)/concentração de oxigênio (FiO2) < 300 mm Hg (WU; MCGOOGAN, 2020). Os pacientes foram hospitalizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo de 6 de abril a 2 de julho de 2020. A Tabela 1 resume os registros clínicos, laboratoriais e de tratamento. Também coletamos amostras de 73 controles saudáveis pareados por idade e sexo. Os controles foram coletados antes da pandemia da COVID-19 ou testaram negativo para COVID-19 usando RT-PCR e/ou sorologia (anticorpos IgM e IgG específicos; kits Asan Easy Test COVID-19 IgM/IgG; Asan Pharmaceutical Co.)

Demografia		%
Número	124	
Idade (anos)	59.25+18.01	
Sexo feminino	50	4 %
Comorbi	dades	
Hipertensão	61	49%
Obesidade	61	49%
Diabetes	46	37%
Tabagismo	33	26%
Doença cardíaca	23	18%
Doença pulmonar	20	16%
Doença renal	13	10%
Câncer	11	8%
Histórico de infarto	9	7%
Imunodeficiência	6	4%
Doenças autoimunes	2	1%

#### Tabela 1. Características dos pacientes com COVID-19

#### Achados laboratoriais

PCR (mg/dL)\*

12.55+8.95

Dímero D (µg/mL)**	2.47+2.59	
LDH (U/liter) <sup>#</sup>	565.147+325.9	
Ferritina (ng/mL) <sup>&amp;</sup>	1,225.07+1,762.9	
Hemoglobina (g/dL)	12.31+2.34	
Neutrófilos (cell/mm <sup>3</sup> )	6,728.443+3,903.57	
Linfócitos (cell/mm <sup>3</sup> )	1307.37+789.1	
Plaquetas (count/mm³)	253,426.2+111,616.3	

Medicamentos			
Heparina	112	90%	
Antibióticos	110	88%	
Glicocorticoides	58	46%	
Oseltamivir	56	45%	
Antimalárico	45 36%		
Capacidade respiratória			
Ventilação mecânica	56	45%	
Oxigênio por cânula nasal	111	89%	
pO <sub>2</sub>	77.77+29.17		
SatO <sub>2</sub>	93.37+5.72		

Gravidade da doença		
Leve	7	6%
Moderada	49	39%
Grave	68	55%
Desfecho clínico		
Morte	34	27%

\*PCR: proteína C reativa (valor normal <0.5 mg/dl); \*\*Dímero D (valor normal <0.5 μg/ml); <sup>#</sup>LDH: lactato desidrogenase (valor de referência: 120–246 U/liter); <sup>&</sup>Ferritina (valor de referência: 10-291 ng/ml)

#### 3.3. Isolamento de PBMCs

O sangue total foi coletado de doadores saudáveis (Protocolo do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética, nº 06825018.2.3001.5440) em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer CPT; BD Biosciences), conforme às instruções do fabricante. O material foi centrifugado a 400 ×g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o plasma foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido em PBS 1x, pH 7,4 (Gibco-BRL). As células foram adicionadas em uma coluna de gradiente Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Biosciences AB). Em seguida, foram centrifugadas a 640×g por 30 min em temperatura ambiente para obter a fração mononuclear purificada, que foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo tubo. As células foram lavadas e o pellet foi ressuspendido em RPMI para análises subsequentes. Para experimentos de infecção in vitro, os PBMCs de voluntários saudáveis foram quantificadas e os monócitos (células CD14+) foram purificados por seleção positiva com nanopartículas magnéticas (BD). Resumidamente, os PBMCs foram marcadas com BD IMag Anti-human CD14 Magnetic Particles - DM. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 48 poços e colocadas sobre um campo magnético da separação de células. As células marcadas migraram em direção ao ímã (fração positiva), enquanto as células não marcadas foram retiradas (fração negativa). A placa foi então removida do campo magnético para ressuspensão da fração positiva. A separação foi repetida duas vezes para aumentar a pureza da fração positiva e os monócitos CD14+ foram usados para experimentos de infecção.

#### 3.4. Macrófagos derivados da medula óssea

Macrófagos derivados da medula óssea foram obtidos como descrito anteriormente [28]. Resumidamente, os camundongos foram sacrificados e as células da medula óssea foram isoladas dos fêmures. As células foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachussetts, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 10% de um meio condicional de célula 3T3, que expressa M-CSF de camundongo como uma fonte de fator de estimulação de colônia de macrófagos, por 7 dias, a 37°C, 5% CO2. As células foram separadas com PBS 1x gelado, ressuspendidas em RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS (R10) e plaqueadas conforme indicado. A incubação de células não infectadas e infectadas foi feita a 37°C, 5% de CO2.

#### 3.5. Produção de estoque viral

O SARS-CoV-2 utilizado foi a cepa Brasil/SPBR-02/2020 que foi propagada em condições de BSL3. Antes da infecção, as células Vero CCL81 foram lavadas com PBS1x. Em seguida, as células foram infectadas com o inóculo viral usando DMEM com tratamento com tripsina-TPCK ( $1\mu g/\mu L$ ) a 37°C, 5% de CO2. Quando o efeito citopático induzido pelo vírus foi observado, as células foram coletadas e centrifugadas ( $10.000 \times g$ ). O sobrenadante foi armazenado a - $80^{\circ}$ C e a titulação do vírus foi realizada em células Vero CCL81.

#### 3.6. Infecção *in vitro* de monócitos humanos

Um total de 2 × 10<sup>5</sup> monócitos humanos purificados foram plaqueados em placas de 48 poços e infectados com SARS-CoV-2 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,2, 1 e/ou 5. Após 1 h de adsorção de vírus, fresco meio (RPMI 2% FBS sem

Vermelho de Fenol), com ou sem o inibidor de NLRP3 MCC950 (InvivoGen), 10 µM, foi adicionado. Como controle para a atividade do vírus, inativamos o SARS-CoV-2 usando irradiação UV por 20 minutos e os usamos no mesmo MOI indicado para o SARS-CoV-2 viável. Como controle negativo, utilizou-se o mock, que consistiu em meio de células Vero não infectadas. Nigericina (20 µM) foi utilizada como controle positivo para ativação do inflamassoma. As células foram incubadas durante 24 h a 37°C na presença de uma atmosfera de 5% de CO2. Após a incubação, as células foram processadas para ensaios de imunofluorescência e o sobrenadante foi coletado para determinação da ativação da caspase-1, produção de citocinas e quantificação de LDH. Para fins de medições do genoma do vírus, as células foram lavadas 1 h após a adsorção do vírus com PBS 1x para remover completamente os vírus não internalizados, e meio fresco (RPMI 2% FBS sem vermelho de fenol) foi adicionado. O genoma do vírus foi medido nos sobrenadantes 8 e 24 h após a infecção.

## 3.7. Avaliação da atividade da caspase-1 ativa e liberação de LDH em monócitos em cultura

Para determinação de caspase-1 e LDH,  $2 \times 10^5$  monócitos CD14+ humanos foram plaqueados em placas de 48 poços em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e incubados durante a noite. No dia seguinte, as células foram infectadas com SARS-CoV-2 usando MOI 5 em RPMI sem vermelho de fenol (3,5 g/litro de Hepes, 2 g/litro de NaHCO3, 10,4 g/litro de RPMI sem vermelho de fenol e 1% de glutamina, pH 7,2). Após 1 h de adsorção do vírus, meios frescos (RPMI 2% FBS sem Phenol Red) com ou sem MCC950 a 10  $\mu$ M foram adicionados e as células foram incubadas por 24 h. Para medir a atividade da caspase-1, os sobrenadantes foram coletados e incubados com o substrato Luciferin WEHD fornecido pelo Caspase-Glo 1 Assay (Promega). Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a luminescência foi medida usando o sistema SpectraMax i3 (Molecular Devices). A liberação de LDH foi medida nos sobrenadantes usando o Kit CytoTox 96 (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

#### 3.8. RT-PCR para SARS-CoV-2

A detecção de SARS-CoV-2 foi realizada com conjuntos de primer-probe para 2019nCoV N2 e gene E, de acordo com os protocolos do grupo de controle e prevenção de doenças dos EUA (CORMAN et al., 2020; NALLA et al., 2020). Os genes avaliados (gene de manutenção N2, E e RNase-P) foram testados por RT-PCR em tempo real de uma etapa usando ácidos nucleicos totais extraídos com TRIzol (Invitrogen) de 50 µl de sobrenadantes celulares para medir o genoma viral dos ensaios in vitro. Todos os ensaios de PCR em tempo real foram feitos em um termociclador de PCR em tempo real Step-One Plus (Applied Biosystems). Resumidamente, a extração de RNA foi realizada por TRIzol. Um total de 100 ng de RNA foi usado para a amplificação do genoma, adicionando primers específicos (20 µM) e sonda (5 µM), e com TaqPath 1-Step RT-PCR Master Mix quantitativo (Applied Biosystems), com os seguintes parâmetros: 25°C por 2 minutos, 50°C por 15 minutos e 95°C por 2 minutos, seguidos por 45 ciclos de 94°C por 5 segundos e 60°C por 30 segundos. Os primers utilizados foram os seguintes: N2 direto: 59-TTACAAACATTGGCCGCAAA-39, N2 reverso: 59-N2: GCGCGACATTCCGAAGAA-39; sonda 59-FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-39 (NALLA et al., 2020); E para frente: 59-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-39, Е reverso: 59-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-39; sonda E: 59-AM-ACAC-TAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ-1-39 (CORMAN et al., 2020); RNase-P direta: 59-AGATTTGGACCTGCGAGCG-39, RNase-P 59reversa: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-39; е sonda RNase-P: 59-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1-39 (NALLA et al., 2020).

### 3.9. Western blotting e ensaio de "pull-down" para avaliação de CASP11 ativa em BMDMs

Para medirmos a expressão de CASP11 por western blot,  $1x10^6$  BMDMs foram infectados com SARS-CoV-2 MOI de 1 por 8h. Em seguida, as células foram lisadas com 40 µL de RIPA suplementado com coquetel de inibidor de protease a 4% (Roche). Para CASP11 ativo,  $1x10^6$  células foram estimuladas com agonista de TLR2 PAM-3Cys por 4 horas para ativação do primeiro sinal, e, em seguida foram reabastecidas com meio fresco contendo 20 µM de biotina-VAD-FMK (Enzo) 15 min antes da

infecção. Em seguida, as células foram infectadas com SARS-CoV-2 MOI de 1 por 8 horas. Em seguida, os BMDMs foram lavados duas vezes com PBS 1x e as células foram lisadas em 100 µL de tampão RIPA suplementado com coquetel inibidor de protease (Roche). Os lisados limpos foram equalizados de acordo com o teor de proteína total, incubados durante a noite com esferas de estreptavidina-sefarose (Invitrogen) e lavadas com tampão RIPA. As proteínas ligadas foram eluídas por ressuspensão em tampão de amostra Laemmli, fervidas por 5 minutos e separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 15%. Após esse processo, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C sob agitação suave com anticorpo Anti-CASP11 (ABCAM) diluído 1:1000 em leite em pó desnatado a 5% em TBS 1X com 0,01 % Interpolação. A β actina foi marcada com anti-β actina de camundongo (Santa Cruz 1:3000) diluída em 5% de leite em pó desnatado em TBS 1X com 0,01% de Tween. As membranas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário de cabra anti-HRP de coelho ou cabra anti-rato de camundongo (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e analisadas usando ECL™ Prime Western Blotting System (GE Healthcare, Illinois, EUA) e um Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Illinois, EUA).

### 3.10. Avaliação da liberação de IL-1β e LDH em sobrenadantes de cultura de BMDMs

2 x 10<sup>5</sup> macrófagos derivados da medula óssea foram plaqueados em placas de 48 poços em RPMI 10% FBS e incubados durante a noite. No dia seguinte, as células foram iniciadas com PAM3cys 300ng/mL por 4 horas. O estímulo PAM3cys foi então removido e as células foram infectadas com SARS-COV-2 usando MOI de 1 e MOI de 5. Após 1h de adsorção, RPMI sem vermelho de fenol (3,5 g/L HEPES, 2 g/L NaHCO3, 10,4 g/L RPMI sem vermelho de fenol, glutamina a 1%, pH 7,2) foi adicionado ao meio completo e as células foram incubadas por 24h. O sobrenadante foi coletado para avaliarmos a liberação de IL-1 $\beta$  e LDH. A liberação de LDH foi medida usando o ensaio CytoTox 96 (Promega, Winsconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A IL-1 $\beta$  foi quantificada por ELISA (R&D Systems) nos sobrenadantes de macrófagos infectados *in vitro* seguindo as instruções do fabricante.

### 3.11. Avaliação da atividade da caspase-1 em PBMCs de pacientes com COVID-19

Para avaliarmos a ativação da caspase-1,  $5 \times 10^5$  PBMCs de pacientes com COVID-19 ou doadores saudáveis foram centrifugados (400 ×g, 10 min) e as células foram marcadas por 30 min com o reagente FLICA carboxifluoresceína (FAM–YVAD–FMK ; Tecnologias de Imunoquímica), conforme recomendado pelo fabricante. As células foram então lavadas duas vezes com PBS 1x e fixadas com reagente fixador fornecido pelo fabricante. A aquisição foi realizada em células fixas em citômetro de fluxo (BD Accuri C6; BD Biosciences) e posteriormente analisadas com o software FlowJo (Tree Star). Para avaliarmos a atividade da caspase-1 em sobrenadantes,  $2 \times 10^5$  PBMCs de pacientes com COVID-19 foram plaqueados em placas de 96 poços e incubados durante a noite. Para medirmos a atividade da caspase-1, os sobrenadantes foram coletados e o ensaio Caspase-Glo 1 (Promega) foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

#### 3.12. Coloração por imunofluorescência de células isoladas

Inicialmente, 5 × 10<sup>5</sup> PBMCs de pacientes com COVID-19 foram plaqueados em câmaras laminares ("chamber slides") de 8 poços por 1 h em RPMI sem FBS para adesão de monócitos antes da fixação. Para marcação de células infectadas in vitro,  $2 \times 10^5$  monócitos humanos foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas e infectados com SARS-CoV-2 no MOI indicado por 16 h. Para fixação das amostras, os sobrenadantes da cultura de tecidos foram removidos e as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. O paraformaldeído foi removido, as células foram lavadas com PBS 1x e as lamínulas ou câmaras foram processadas para imunofluorescência conforme descrito. As células foram bloqueadas e permeabilizadas usando PBS 1x com soro de cabra e saponina a 0,05% por 1 h em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram mAb de coelho anti-NLRP3 humano (clone D2P5E, lote 2; 1: 1.000; Cell Signaling) ou anticorpo policional de coelho anti-ASC humano (1:2.000; Adipogen AL177). Os anticorpos foram diluídos em solução de bloqueio e adicionados a cada câmara/lamínula. Após 1 h de incubação, as amostras foram lavadas com PBS 1 × e os anticorpos secundários foram adicionados e incubados por 1 h à temperatura

ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram feitos em cabra anti-coelho 488 (1:3.000; Invitrogen) e anti-coelho 594 (1:3.000; Life Technologies). As lâminas foram lavadas e montadas usando DAPI (1 mM) e ProLong (Invitrogen).

#### 3.13. Amostras de pulmão de autópsias

De maio a julho de 2020, 47 pacientes diagnosticados com SARS-CoV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil (Ribeirão Preto, SP, Brasil) foram submetidos a autópsia minimamente invasiva em 1 hora de morte. Uma biópsia pulmonar cirúrgica post-mortem foi realizada com uma incisão de 3 cm no lado anterior do tórax entre a quarta e quinta costelas. Uma agulha de corte de calibre 14 correspondente (Magnum Needles, Bard) e uma pistola de biópsia (Magnum, Bard) também foram usadas. Os pacientes que faleceram por adenocarcinoma entre os anos de 2012 a 2020 foram utilizados como controles e amostras de tecidos de necropsias pulmonares foram obtidas no Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil. As amostras foram incluídas em parafina e fixadas em formalina (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

#### 3.14. Imunofluorescência e imagem de amostras de pulmão de autópsias

As amostras de tecido pulmonar de autopsias foram incubadas com os anticorpos primários, feitos em coelho, anti-CD14 (1:200; Abcam), anti-NLRP3 humano (clone D2P5E; 1: 3.000; Cell Signaling) e anticorpo policional anti-ASC humano (1:2.000; Adipogen AL177) por 2 h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. Anticorpos anti-rato Alexa Fluor 647 (Invitrogen) ou cabra anti-coelho Alexa Fluor 594 (Invitrogen) feitos em cabra foram usados como anticorpo secundário. As imagens foram adquiridas por um microscópio ZEISS Axio Observer combinado com um aparelho confocal LSM 780 com aumento de 630x. As autópsias minimamente invasivas foram aprovadas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (protocolo nº 4.089.567).

#### 3.15. Marcação e apagamento sequencial de imunoperoxidase

Cortes de tecido de pulmão embebidos em parafina obtidos de casos fatais de COVID-19 foram testados por imuno-histoquímica usando anticorpo policional anti-SARS-CoV-2 para detecção in situ de SARS-CoV-2. A marcação, apagamento e nova marcação foi feita sequencialmente para determinar marcadores adicionais após a coloração imunológica de SARS-CoV-2, usando anticorpos para CD14 (diluição 1:100; Abcam) e NLRP3 (diluição 1: 100; Cell Signaling). Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com um sistema de visualização anti-rato de polímero de imunoperoxidase (SPD-125; Spring Bioscience, Biogen) e, em seguida, com o substrato cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), kit de peroxidase (SK-4200; Vector Laboratories). As microfotografias após imunocoloração de lâminas de tecido foram digitalizadas em um microscópio VS120 Olympus. Após escaneamento de alta resolução, as lâminas com lamínulas foram removidas em PBS 1x e desidratadas em gradiente de etanol até o etanol 95%. As lâminas foram incubadas em etanol em várias concentrações até que a reação de cor AEC fosse apagada. Após a reidratação, os anticorpos foram eluídos por seções de incubação em solução de KMnO4 0,15 mM/H2SO4 0,01 M por 2 min, seguido imediatamente por uma lavagem com água destilada. A marcação é então reiniciada.

#### 3.16. Quantificação de citocinas em soros de pacientes

Os níveis ativos de caspase-1 (Casp1p20) e IL-18 foram avaliados por ensaio de ELISA (R&D Systems) no soro de pacientes com COVID-19 ou doadores saudáveis seguindo as instruções do fabricante. TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17 foram quantificados nos soros de pacientes com COVID-19 ou doadores de saúde usando um kit de citocinas humanas "cytometric bead array" (CBA) (Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit; BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes de cultura de tecidos de monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 foi quantificada por ELISA (R&D Systems) ou pelo conjunto CBA Human IL-1 $\beta$  flex (BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante.

## 3.17. Dados de sequenciamento de RNA de swab nasofaríngeo de pacientes com COVID-19

A tabela de contagem de genes e metadados foram fornecidos por autores do GEO (GSE163151). Em seguida, foi realizada a análise de expressão diferencial com o pacote DESeq2 usando os parâmetros padrão (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Os pacientes com COVID-19 foram subdivididos em 3 grupos de acordo com a gravidade da doença: Pacientes com COVID-19 não hospitalizados (N = 58); Pacientes com COVID-19 hospitalizados, mas não em UTI (N = 17); e UTI (N=8). As análises de correlação de Pearson entre CASP4 e CASP1 e entre CASP4 e IL1B foram realizadas em R usando dados normalizados de contagem de UQ, que foram gerados usando o pacote EDAseq (RISSO et al., 2011).

#### 3.18. Western blotting para CASP4

1x10<sup>7</sup> PBMCs de controles saudáveis (HC, n=9) ou pacientes com COVID-19 (n=11) foram lisados em 50uL de RIPA (10mM Tris-HCI (pH 7,4), 1mM EDTA, 150mM NaCI, 1% Nonidet P-40, 1% (p/v) de desoxicolato de sódio e 0,1% (p/v) SDS) suplementado com 4% de coquetel inibidor de protease (Roche). As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 15%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C sob agitação leve com anticorpo mAb coelho anti-CASP4 (Cell Signaling, 1:1000) diluído 1:1000 em 5% BSA em TBS 1X com 0,01% Tween. As membranas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário HRP anti-coelho de cabra (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e analisadas usando ECL<sup>™</sup> Prime Western Blotting System (GE Healthcare, Illinois, EUA) e um Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Illinois, EUA).

#### 3.19. Extração de RNA e RT-PCR para genes inflamatórios

O RNA total de tecido pulmonar fresco de pacientes com SARS-CoV-2 e respectivos controles foi obtido usando o reagente Trizol e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por espectrofotometria em espectrofotômetro NanoDrop 2000c. A concentração foi ajustada para 1 ug/µL e o RNA foi armazenado a -80 ∘C até a transcrição reversa. Para quantificação dos genes

inflamatórios, o RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (sem inibidor) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, EUA). A PCR em tempo real foi realizada em placas de 96 poços utilizando reagentes Sybr Green (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) e um sistema de PCR em tempo real Quant studio (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os valores de Ct foram analisados pelo método comparativo de Ct (ΔΔCt) e normalizados para o controle endógeno GAPDH. A diferença de dobras foi calculada como  $2-\Delta\Delta$ Ct. Os primers usados para genes humanos incluíram: GSDMD: F:ATGAGGTGCCTCCACAACTTCC e R:CCAGTTCCTTGGAGATGGTCTC; NLRP3: F:GGACTGAAGCACCTGTTGTGCA e R:TCCTGAGTCTCCCAAGGCATTC; IL1A: F:TGTATGTGACTGCCCAAGATGAAG R:AGAGGAGGTTGGTCTCACTACC; е IL1RA: F:ATGGAGGGAAGATGTGCCTGTC e R:GTCCTGCTTTCTGTTCTCGCTC; NLRC4: F:AGGTCCCACAACTCGTCAAGCT e R:TGCTCACACGATTTCCCGCCAA; PYCARD: F:AGCTCACCGCTAACGTGCTGC e R:GCTTGGCTGCCGACTGAGGAG; NLRP1: F:ATTGAGGGCAGGCAGCACAGAT e R:CTCCTTCAGGTTTCTGGTGACC; CASP1: F:GCTGAGGTTGACATCACAGGCA e R:TGCTGTCAGAGGTCTTGTGCTC; AIM2: F:GCTGCACCAAAAGTCTCTCCTC e R:CTGCTTGCCTTCTTGGGTCTCA: IL6: F:AGACAGCCACTCACCTCTTCAG e R:TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG; GAPDH: F:GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG e R:ACCACCCGTTGCTGTAGCCAA; TNFA: F:CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG e R:ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC; IL10: F:TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA e R:TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA; IL1B: F:CCACAGACCTTCCAGGAGAATG e R:GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG; IL18: F:GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG е R:CCTTGATGTTTATCAGGAGGATTCA; CASP4: F:GGGATGAAGGAGCTACTTGAGG R:CCAAGAATGTGCTGTCAGAGGAC; е IL17A: F:CGGACTGTGATGGTCAACCTGA e R:GCACTTTGCCTCCCAGATCACA; IFNG: F:GAGTGTGGAGACCATCAAGGAAG е R:TGCTTTGCGTTGGACATTCAAGTC; IFNB1: F:CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC R:TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA; е IFNA1: F:AGAAGGCTCCAGCCATCTCTGT e R:TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGA; IL4: F:CCGTAACAGACATCTTTGCTGCC e R:GAGTGTCCTTCTCATGGTGGCT.

#### 3.20. Animais e infecções in vivo

Neste estudo utilizamos animais com background genético C57BL/6, incluindo o K18hACE2 (B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J; Jackson Laboratory cepa #: 034860) que foi cruzado com Casp11<sup>-/-</sup> para geração de hACE2<sup>+/-</sup> Casp11<sup>+/-</sup>, que foram cruzados para a geração de hACE2<sup>+/-</sup> Casp11<sup>+/+</sup>, hACE2+/- Casp11<sup>+/-</sup> e h-ACE2<sup>+/-</sup> Casp11<sup>-/-</sup>. Camundongos machos ou fêmeas de oito a dez semanas de idade foram infectados em uma unidade de BSL3 da Universidade de São Paulo, FMRP/USP. Todos os animais receberam ração e água ad libitum, a 25°C. Experimentos de infecção foram realizados com camundongos de 8 a 10 semanas de idade. Os animais foram anestesiados com cetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal e infectados por via intranasal com SARS-CoV-2 2x10<sup>4</sup> PFU contido em 20 µL de PBS 1x foi administrado por via intranasal. Do dia 0 ao dia 10, os animais foram avaliados quanto ao peso, temperatura e escore clínico. A pontuação clínica foi medida de acordo com a perda de peso, postura e aparência dos camundongos, atividade, abertura dos olhos, responsividade a estímulos, respiração (Tabela 2). No ponto de tempo indicado, os camundongos foram sacrificados e os pulmões foram coletados para as análises seguintes. Para curvas de mortalidade, a sobrevivência dos camundongos foi monitorada diariamente com alimentos e água fornecidos ad libitum.

Variável	Avaliação	Escore
Peso	0% de perda	0
	1 a 5% de perda	1
	6 a 10% de perda	2
	11 a 15% de perda	3
	16 a 20% de perda	4

#### Tabela 2. Escore clínico

	>20% de perda	5
Postura e aparência	Sem piloerição	0
	Com piloerição	1
Atividade	Ativo	0
	Atividade moderada	1
	Pouca atividade	2
	Imóvel	3
Olhos (abertura)	Normal	0
	Fechamento lento	1
	Fechados	2
Responsividade ao estímulo	Normal	0
	Moderada	1
	Baixa	2
Respiração	Normal	0
	Alterada (esforço)	1

#### 3.21. Quantificação da carga viral em amostras de pulmão de camundongos

A titulação de vírus de estoques virais de homogenatos de pulmão de camundongo infectado foi realizada usando diluição limitante padrão para confirmar a dose

infecciosa de cultura de tecidos de 50% (TCID50) do estoque viral propagado (REED; MUENCH, 1938). A quantificação viral por RT-PCR, foi realizada com conjuntos primer-probe para 2019-nCoV\_N2, de acordo com os protocolos do grupo USA-CDC e Charité (CORMAN et al., 2020; LU et al., 2020b) já descritos acima.

## 3.22 Quantificação de citocinas e avaliação histológica em homogenatos pulmonares de camundongos

Os níveis de IL-1β foram avaliados no homogenato de tecido pulmonar dos pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2 por ELISA. TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10, IFNγ e MCP-1 foram quantificados em homogenatos de tecido pulmonar de camundongos por CBA (CBA Mouse Inflammation Kit, BD) seguindo as instruções do fabricante. Para avaliação histológica, amostras de tecido pulmonar de camundongos foram fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) em cortes de 3 µm. As lâminas de tecido foram escaneadas em um microscópio Olympus VS120 com alta resolução para realizar a análise histológica da área do parênquima medindo a porcentagem da área aerada usando o software imageJ.

#### 3.23. Análise estatística

A significância estatística para a análise linear foi determinada pelo teste t de Student bicaudal pareado ou não pareado para dados que atingiram distribuição normal, e o teste de Mann-Whitney foi usado para dados não distribuídos normalmente. Esses procedimentos estatísticos e gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism 8.4.2. Além disso, análises longitudinais foram implementadas para descrever a variação na produção de IL-18 e Casp1p20 ao longo do tempo, considerando os resultados dos pacientes e o sexo como fatores fixos. Essas análises foram realizadas em R (versão 4.0.2) utilizando o RStudio (versão 1.3.1056). Os desfechos dos pacientes foram divididos em três categorias (37 pacientes no total; 16 mulheres e 21 homens): óbito (n = 10 indivíduos, total de 25 amostras), recuperação leve (pacientes que foram hospitalizados, mas não necessitaram de VM; n = 17 indivíduos, totalizando 53 amostras) e crítico-recuperação (pacientes que necessitaram de VM na unidade de terapia intensiva e se recuperaram; n = 10 indivíduos, totalizando 27 amostras). A

ativação de IL-18 e Casp1 foram avaliadas separadamente usando modelos completos que consideraram a interação do tempo ("Day.sampled") com os desfechos dos pacientes ("Desfecho") ou sexo ("Sexo") e incluíram indivíduos ("Patient.ID") como um fator aleatório para controlar medidas repetidas e efeitos individuais. A normalidade e a homoscedasticidade do conjunto de dados foram verificadas e refutadas para um conjunto de dados de séries temporais, e as análises foram implementadas usando o pacote glmmTMB (BROOKS et al., 2017) em uma abordagem de modelo misto generalizado com distribuição "gama" e função de link "log". Um critério de informação de Akaike para amostras finitas foi usado para selecionar os melhores modelos das amostras finitas completas usando MuMIn (BARTON; BARTON, 2020). Modelos com critério de informação de Akaike para valores de amostra finita dentro de 2 U do modelo de melhor ajuste foram considerados como tendo suporte substancial (GUTHERY; BURNHAM; ANDERSON, 2003); foram confirmadas distribuições de resíduos adequadas e construídos gráficos e tabelas representativas usando os pacotes DHARMa (HARTIG, 2020), ggeffects (LÜDECKE, 2018) e broom.mixed (BOLKER & ROBINSON, 2020)

O Teste Kruskall-Wallis com correção de Dunn foi realizado para dados in vivo com 3 comparações de grupos, enquanto Mann-Whitney foi usado para as 2 comparações de grupos. O teste de Kaplan-Meier foi realizado para curvas de sobrevida. Esses procedimentos estatísticos e gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism 8.4.2. A distribuição normal em amostras de expressão gênica pulmonar foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk; os dados foram analisados por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney e correlação de Spearman.

# Resultados

#### 4. RESULTADOS

### 4.1. A infecção por SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 em monócitos primários humanos

A resposta inflamatória exacerbada existente na COVID-19, caracterizada pelo aumento de marcadores como a enzima lactato desidrogenase (LDH), que é associada a morte celular lítica, além da tempestade de citocinas, tais como IL-6 e IL-1 (CHEN et al., 2020b; HAN et al., 2020; HUANG et al., 2020b; POGGIALI et al., 2020) nos levou a buscar compreender a possível participação do inflamassoma no desenvolvimento dessa doença.

Inicialmente, isolamos monócitos humanos CD14+ a partir dos PBMCs obtidos de doadores saudáveis e infectamos com SARS-CoV-2 para avaliarmos a ativação do inflamassoma. O mock (sobrenadante da vero não infectada) foi usado como um controle negativo de infecção. Observamos que a infecção por SARS-CoV-2 desencadeou a ativação da caspase-1 (CASP1), como observado através do ensaio de luminescência chamado Caspase-Glo 1 (**Fig. 9 A**) e induziu a produção de IL-1 $\beta$  avaliada pelo ensaio de ELISA (**Fig. 9 B**). É interessante notar que a ativação da CASP1 e a produção de IL-1 $\beta$  ocorreu somente em resposta a um vírus SARS-CoV-2 viável, pois como podemos observar, o vírus inativado por UV não induziu a ativação da CASP1 e a produção de IL-1 $\beta$  (**Fig. 9 A**, **B**). É importante ressaltar que a ativação da CASP1 induzida por SARS-CoV-2 e a produção de IL-1 $\beta$  foi inibida pelo MCC950, um inibidor seletivo de NLRP3.

Também medimos a liberação de LDH em resposta à infecção e observamos que o SARS-CoV-2 induziu a liberação de LDH em monócitos por um processo independente de primeiro sinal ou "priming" das células e, para ocorrer, necessita de SARS-CoV-2 viável (**Fig. 9 C**). Observamos também que o MCC950 não afetou a liberação de LDH, sugerindo que respostas independentes de NLRP3 operam para a indução de uma forma de morte celular lítica induzida pelo vírus (**Fig. 9 C**). Resultados semelhantes foram obtidos quando testamos simultaneamente monócitos de 3 doadores diferentes (**Fig. 9 A-C**).

Em seguida, medimos a formação de "puncta" de NLRP3 e ASC e evidenciamos que o SARS-CoV-2 desencadeia a formação de "puncta" em um processo que requer vírus viável (**Fig. 9 D-E** e **Fig. 10 D-E**). O MCC950 não inibiu significativamente a

formação de "puncta" de ASC, o que nos levou a acreditar que possivelmente existem outros inflamassomas dependentes de ASC que podem ser ativados por SARS-CoV-2 (**Fig. 10 D**).

A fim de avaliarmos a permissividade dos monócitos humanos a infecção, realizamos um ensaio de RT-PCR para o gene N2 e confirmamos que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar monócitos humanos *in vitro* (**Fig. 9 F**). Coletivamente, esses dados sugerem que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar monócitos humanos e desencadear a ativação de NLRP3, além de induzir uma morte celular lítica. Diferente da ativação da CASP1, produção de IL-1 $\beta$  e formação de "puncta" de NLRP3, a liberação de LDH não foi afetada pelo tratamento com o MCC950, sugerindo que vias adicionais podem operar para indução de morte de células líticas em resposta ao SARS-CoV-2. Essa morte celular será melhor investigada posteriormente.



Figura 9. A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 e morte celular. Monócitos CD14+ humanos foram primados ou não

com Pam3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 utilizando um MOI de 5 (ou conforme indicado) por 24 horas. O mock (sobrenadante da vero não infectada) foi usado como um controle negativo de infecção, e a nigericina foi usada como um controle positivo para ativação de NLRP3. O inibidor de NLRP3, MCC950 (10 µM), foi adicionado 1 h após a infecção viral e mantido (S.CoV-2 + 950). Quando indicado, o SARS-CoV-2 foi inativado por irradiação UV (UV Inat.). (A) A atividade da caspase-1 foi medida nos sobrenadantes da cultura de tecidos usando o ensaio Caspase-Glo 1. (B) Produção de IL-16 nos sobrenadantes de cultura de tecidos. (C) Liberação de LDH nos sobrenadantes da cultura de tecidos. Triton (9%) foi usado para induzir a morte celular e estimar 100% da morte. (D) A porcentagem de células contendo "puncta" de NLRP3 foi estimada por microscopia confocal. (E) É mostrada uma imagem representativa de um monócito contendo "puncta" de NLRP3 (verde, indicado por setas). A inserção (vermelho) mostra uma ampliação maior da imagem contendo uma célula com a presença de "puncta" de NLRP3. DAPI cora os núcleos das células (azul). Barra de escala de 10 µm. (F) Cargas virais nos sobrenadantes de cultura de células foram estimadas por RT-PCR em monócitos infectados por 8 e 24 h no MOI indicado. # indica P <0,05 em comparação com células tratadas Mock e \* indica P <0,05 comparando os grupos indicados, conforme determinado pelo teste t de Student. A caixa mostra a média de triplicados ± DP dos valores. É mostrado na figura um experimento representativo de 3 experimentos (A-F) realizados com resultados semelhantes.



Figura 10. A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma de NLRP3 e morte celular. (A - C) Monócitos humanos CD14+ obtidos

de três doadores saudáveis independentes (cada um marcado com uma cor diferente) foram preparados com Pam3Cys (300 ng/mL) por 4 h e infectados com SARS-CoV-2 MOI 5 por 24 h. Mock foi usado como um controle negativo de infecção e nigericina como um controle positivo para ativação de NLRP3. O inibidor de NLRP3 MCC950 (10 µM) foi adicionado 1 h após a infecção viral e mantido (S.CoV-2 + 950). O SARS-CoV-2 foi inativado por irradiação UV (U.V. Inat.). (A) A atividade da caspase-1 foi medida nos sobrenadantes da cultura de tecidos usando o ensaio Caspase-Glo 1. (B) produção de IL-18 nos sobrenadantes de cultura de monócitos. (C) Liberação de LDH medida nos sobrenadantes da cultura de tecidos. Triton X-100 (9%) foi usado para induzir a morte celular e estimar 100% da morte. (D) Monócitos CD14 + humanos obtidos de um único doador foram preparados ou não com Pam3Cvs (300 ng/mL) por 4 h e infectados com SARS-CoV-2 MOI 5 por 24 h. A porcentagem de células contendo "puncta" de ASC foi estimada por microscopia confocal. (E) Uma imagem representativa de monócitos contendo "pucnta" de ASC (verde, indicado por setas brancas) é mostrado. O destaque (vermelho) mostra uma ampliação mais alta de uma célula contendo "puncta" de ASC. DAPI cora os núcleos das células (azul). Barra de escala 10 µm. #, P <0,05 em comparação com as células tratadas com Mock; \*, P <0,05 comparando os dois grupos indicados, conforme determinado pelo teste t de Student. A caixa mostra o média ± DP dos valores. (A – C) Cada quadrado representa dados de um único doador (A – C) ou dados de quatro repetições técnicas realizadas usando células de um doador único (D). Mostramos um experimento representativo de três experimentos independentes realizados com resultados semelhantes.

### 4.2. A CASP4 é expressa e ativa em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2

A fim de compreendermos se a via não canônica de ativação do inflamassoma de NLRP3 através da ativação de caspase-4 (CASP4) ocorreria em resposta a infecção com SARS-CoV-2, infectamos monócitos humanos isolados de indivíduos saudáveis e avaliamos a expressão e a ativação de CASP4 nessas células. Observamos que a infecção induziu o aumento significativo da expressão de CASP4, avaliada por RT-PCR (**Fig. 11 A**). Além disso, investigamos a ativação de CASP4 por um ensaio de fluorescência que avalia a Ac-WEHD-FC que é um substrato da CASP4, demonstrando que há um aumento de CASP4 ativa em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 com um MOI de 5 (**Fig. 11 B**).



**Figura 11. A infecção de monócitos humanos primários com SARS-CoV-2 desencadeia a expressão e ativação de caspase-4.** Monócitos CD14+ humanos foram primados com Pam3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 utilizando MOI1 e/ou MOI 5 por 24 horas. O mock (sobrenadante da vero não infectada) foi usado como um controle negativo de infecção, e nigericina como um controle positivo para ativação de NLRP3. Quando indicado, o SARS-CoV-2 foi inativado por irradiação UV (UV Inat.) de acordo com o MOI utilizado. (A) A expressão genica de caspase-4 foi avaliada por RT-PCR em monócitos infectados por 24 h no MOI indicado. (B) A ativação de capase-4 foi avaliada utilizando um Kit de fluorescência Ac-WEHD-FC em monócitos infectados após 8 horas. \* indica P <0,05 em comparação com células tratadas Mock e \* indica P <0,05, conforme determinado pelo teste t de Student. É mostrado um experimento representativo de 2 experimentos realizados com resultados semelhantes.

### 4.3. A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2

Tendo observado que o SARS-CoV-2 induz a ativação do inflamassoma de NLRP3 e sabendo que a caspase-11 (CASP11) desencadeia a ativação não canônica do inflamassoma NLRP3 em células de camundongos (KAYAGAKI et al., 2011), buscamos investigar se a CASP11 pode estar envolvida na ativação não canônica de NLRP3 durante a infecção por SARS-CoV-2. Para isso, inicialmente, testamos se a infecção por SARS-CoV-2 induz aumento da expressão de CASP11 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongo (BMDMs) e descobrimos que o SARS-CoV-2 viável, mas não o vírus irradiado por UV, induziu a expressão de CASP11 aumentada (**Fig. 12 A**). Além disso, observamos que o NLRP3 não foi necessário para a regulação positiva de CASP11 pela infecção por SARS-CoV-2 uma vez que BMDMs *NIrp3-/-* tiveram uma resposta semelhando aos BMDMs WT (**Fig. 12 A**).

Para investigarmos não somente a expressão, como também a ativação da CASP11 em resposta à infecção, realizamos um ensaio de "pull-down de estreptavidina em células tratadas com Biotina-VAD-FMK e, em seguida, marcadas para CASP11 ativa por Western blot (CUNHA et al., 2015). Através deste ensaio, demonstramos que a infecção por SARS-CoV-2 induziu a ativação de CASP11 em BMDMs quando comparado ao grupo Mock, que são células tratadas com sobrenadante de células vero não infectadas (**Fig. 12 B**).

A fim de elucidar a importância da CASP11 para a ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta ao SARS-CoV-2, infectamos BMDMs e mensuramos a produção de IL-1 $\beta$  por ELISA, como uma forma de avaliarmos a ativação do inflamassoma. Observamos que o SARS-CoV-2 viável, mas não o vírus inativado por UV, induziu a produção de IL-1 $\beta$  nos macrófagos C57BL/6 e esse processo foi prejudicado nos macrófagos *Casp11*<sup>-/-</sup> (**Fig. 12 C**). Utilizamos como controle positivo a nigericina, uma toxina bacteriana que atua como um forte ativador do inflamassoma de NLRP3. Esses dados sugerem que o SARS-CoV-2 induz a ativação do inflamassoma em um processo dependente de NLRP3 e CASP11.


**Figura 12. O CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2.** Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6, NIrp3–/– e Casp11–/– foram preparados e usados para infecções. (A) BMDMs foram infectados com SARS-CoV-2 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 por 8h. A análise de Western blotting do lisado celular foi realizada para avaliar a expressão de CASP11 após a infecção. (B) BMDMs C57BL/6 foram iniciados com PAM3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 em um MOI de 1 por 8h. O pull-down do CASP11 ativo foi realizado pela adição de Biotina-VAD-FMK seguido por esferas de estreptavidina. (C) BMDMs foram iniciados com PAM3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 em MOI de 1 para 24 e os níveis de IL-1β em sobrenadantes livres de células foram medidos por ELISA. \* indica P < 0,05 comparado a MOCK no mesmo background genético e # indica P < 0,05 comparado a C57BL/6 nas mesmas condições. Ambos determinados pelo teste t de Student. Os gráficos mostram a média ± SD dos valores.

# 4.4. O SARS-CoV-2 induz a morte celular em macrófagos por diversas vias e pode ocorrer de maneira independente do inflamassoma

Uma vez que a ativação do inflamassoma induz não somente a produção de IL-1β como também a morte celular inflamatória chamada piroptose (BROZ; DIXIT, 2016a), avaliamos a liberação de LDH como um parâmetro de avaliação de morte celular lítica. No entanto, nosso resultado prévio demonstrado na na **Fig. 9 C** sugere

que a morte celular lítica ocorre em monócitos de maneira independente de NLRP3. Por isso, decidimos avaliar melhor as possíveis vias de morte celular envolvidas nesse processo utilizamos macrófagos de animais deficientes para moléculas do inflamassoma ou em outras formas de morte celular. Observamos que a infecção por SARS-CoV-2 induziu a liberação de LDH mesmo na ausência de CASP11, NLRP3 e na ausência de ambas, CASP1 e CASP11 (Fig. 13 A). Esse dado sugere que o SARS-CoV-2 é capaz de induzir a morte celular por outras vias independentes do inflamassoma. A fim de compreender melhor possíveis vias envolvidas, avaliamos a liberação de LDH em resposta a infecção por SARS-CoV-2 na ausência de outras moléculas importantes para o processo de morte celular, seja piroptose, apoptose, necroptose ou até autofagia. Observamos que a morte celular ocorreu após a infecção mesmo na ausência de moléculas essenciais para a piroptose como observado em BMDMs deficientes para GSDMD e ASC/CASP1/CASP11 (Fig. 13 B). Embora na ausência de ASC/CASP1/CASP11 haja uma redução significativa da liberação de LDH em BMDMs infectados com MOI1 guando comparados com BMDMs WT, em maiores quantidades de vírus, observadas na condição MOI5, os níveis de LDH são similares aos BMDMs WT. Quando avaliamos a dupla ausência de moléculas da apoptose e piroptose utilizando BMDMs Casp7/GSDMD<sup>-/-</sup>, também não identificamos diferença na morte celular. Do mesmo modo, guando utilizamos BMDMs Casp8/Ripk <sup>/-</sup>, também não houve diferença na liberação de LDH após a infecção com SARS-CoV-2. Interessantemente, vimos que, na ausência de ATG5, uma molécula chave no processo de autofagia, a morte celular lítica foi significativamente aumentada, demonstrando a importância da autofagia nesse controle da morte celular durante a infecção por SARS-CoV-2 (Fig. 13 B). Com esses dados, sugerimos que o SARS-CoV-2 induz a morte celular por diferentes vias distintas.



Figura 13. A morte celular induzida por SARS-CoV-2 em macrófagos ocorre por diversas vias e pode ser independente do inflamassoma. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6,  $NIrp3^{-/-}$  e Casp11<sup>-/-</sup> foram preparados e usados para infecções. (A) BMDMs foram primados com PAM3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 em MOI de 1 por 24 e os níveis de LDH no sobrenadante foram medidos por ELISA. \* indica P < 0,05 comparado a MOCK no mesmo background genético e # indica P < 0,05 comparado a C57BL/6 nas mesmas condições. Ambos determinados pelo teste t de Student. Os gráficos mostram a média ± SD dos valores.

### 4.5. O IFN-I é capaz de regular negativamente a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2

Também é importante o melhor entendimento das possíveis vias de regulação da ativação do inflamassoma durante a infecção por SARS-CoV-2. Dado que o IFN-I é importante para o controle de respostas virais e que existem trabalhos que demonstram que o IFN-I pode regular negativamente o inflamassoma (BANERJEE et al., 2018; BURKE et al., 2020; GUARDA et al., 2011) avaliamos como a sinalização de IFN-I poderia atuar nesse processo de ativação do inflamassoma. Para isso, infectamos BMDMs C57BL/6 e *Ifnar*<sup>-/-</sup> e avaliamos a liberação de IL-1 $\beta$  como um produto da ativação do inflamassoma e observamos que há um aumento da liberação de IL-1 $\beta$  na ausência do receptor de IFN-I (IFNAR), demonstrando que essa via de sinalização regula a ativação do inflamassoma pela infecção viral. Por outro lado, a ausência de IFNAR não interfere na morte celular lítica induzida pelo SARS-CoV-2 observada através da liberação de LDH (**Fig. 14 B**)

Α

В



**Figura 14. IFN-I é capaz de regular negativamente a ativação do inflamassoma em macrófagos infectados com SARS-CoV-2.** Macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs) de camundongos C57BL/6 e *Ifnar*<sup>-/-</sup> foram plaqueados e usados para infecções. (A) BMDMs foram primados com PAM3Cys (300 ng/mL) por 4 horas e infectados com SARS-CoV-2 em MOI de 1 por 24h e os níveis de IL-1β no sobrenadante foram medidos por ELISA. (B) A liberação de LDH também foi mensurada no

sobrenadante. \* indica P < 0,05 comparado a mock no mesmo background genético e # indica P < 0,05 comparado a C57BL/6 nas mesmas condições. Ambos determinados pelo teste t de Student. Os gráficos mostram a média ± SD dos valores. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes.

# 4.6. A produção de IL-18 durante a infecção por SARS-CoV-2 é dependente da ativação não canônica via caspase-11 do inflamassoma de NLRP3

Sabendo que a ativação do inflamassoma foi dependente de CASP11 em macrófagos infectados *in vitro* (**Fig. 12**), buscamos compreender se *in vivo* a ativação do inflamassoma também é dependente da via não canônica de ativação de NLRP3. Para avaliarmos a importância da caspase-11 na resposta do hospedeiro ao SARS-CoV-2 *in vivo*, geramos camundongos transgênicos K18-hACE2 (Zheng et al., 2021) deficientes para CASP11, NLRP3, Asc/Casp1/Casp11 e Casp1/11. Os camundongos foram infectados com SARS-CoV-2 2x10<sup>4</sup> PFU, via intranasal, (**Fig. 15 A**), e os níveis de IL-18 foi dosado no pulmão desses animais. Observamos que a IL-18 estava reduzida na ausência de CASP11 a níveis idênticos aos observados em animais NIrp3<sup>-/-</sup> e até mesmo aos níveis presentes em animais ASC/Casp1/Casp11<sup>-/-</sup> (**Fig. 15 B**), indicando que a via de CASP11 é chave na ativação do inflamassoma e produção de IL-18 mediada pela infecção por SARS-CoV-2.



Figura 15. A produção de IL-18 durante a infecção por SARS-CoV-2 é dependente da ativação não canônica via caspase-11 do inflamassoma de NLRP3. (A)Camundongos K18-hACE2 WT, Casp11<sup>-/-</sup>, NIrp3<sup>-/-</sup>, Asc/Casp1/Casp11<sup>-/-</sup> e Casp1/11<sup>-/-</sup> foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por 3 dias e, após a eutanásia, os pulmões foram coletados. A citocina IL-18 foi avaliada por ELISA no homogenato pulmonar seguindo as instruções do fabricante. \* P < 0,05, conforme determinado Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn. A caixa mostra a média ± SD dos valores.

# 4.7. A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma de NLRP3 nos pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2

Para avaliarmos a importância da caspase-11 na resposta do hospedeiro ao SARS-CoV-2 *in vivo*, utilizamos camundongos "little matte controls" para hACE2 *Casp11*<sup>+/+</sup>, *Casp11*<sup>+/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup>, os quais foram infectados com SARS-CoV-2 2x10<sup>4</sup> PFU, via intranasal. Inicialmente, investigamos o efeito da CASP11 na replicação viral no pulmão desses animais após 3 dias de infecção. A caspase-11 não demonstrou ser importante para a replicação viral quando medimos as cargas virais por TCID50 ou RT-PCR nesse tempo pós infecção (**Fig. 16 A-B**).

Em seguida, avaliamos a importância da CASP11 para a ativação do inflamassoma no pulmão dos animais infectados com SARS-CoV-2. Avaliamos a formação de "puncta" de NLRP3 e ASC, um processo que indica a ativação do inflamassoma de NLRP3 e ocorre em resposta à infecção por SARS-CoV-2 e em pacientes com COVID-19 (RODRIGUES et al., 2020). Confirmamos que camundongos infectados com SARS-CoV-2 induzem a formação de "puncta" nos pulmões de camundongos hACE2 *Casp11*<sup>+/+</sup> e esse processo foi reduzido em camundongos hACE2 *Casp11*<sup>-/-</sup> (**Fig. 16 C-D**). Camundongos não infectados e tratados com sobrenadante de células vero, grupo "mock", mostram formação de "puncta" não significativa. Imagens microscópicas dos pulmões infectados ilustram NLRP3 e ASC puncta nos pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2 (**Fig. 8 E-F**).



**Figura 16. A CASP11 é importante para a ativação do inflamassoma em humanizados com ACE2 humanizada infectados com SARS-CoV-2**. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 *Casp11<sup>+/+</sup>*, *Casp11<sup>+/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>* controle da mesma ninhada. Os animais foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por 3 dias. A carga viral foi avaliada por TCID50 (A) e por RT-PCR para o gene SARS-CoV-2 N2 (B). A porcentagem de células contendo "puncta" de NLRP3 (C) e ASC (D) foi estimada por microscopia multifotônica de tecidos pulmonares. Imagens de microscopia multifotônica de tecidos pulmonares coradas com anti-NLRP3 (E) ou ASC (F) indicam "puncta" de inflamassoma (pontos vermelhos, indicados por setas brancas). DAPI cora os núcleos das células. Barra de escala 10 μm.

Corroborando com os dados de formação de "puncta", observamos uma produção reduzida de IL-1 $\beta$  em animais *Casp11<sup>-/-</sup>* quando comparadas com animais *Casp11<sup>+/+</sup>* após 3 dias de infecção (**Fig. 17 A**). Outras citocinas foram medidas, incluindo: IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$  e MCP-1. Embora tenham sido encontradas em níveis ligeiramente menores em camundongos *Casp11<sup>-/-</sup>*, esses dados não foram estatisticamente significativos em comparação com camundongos *Casp11<sup>+/+</sup>* e *Casp11<sup>+/-</sup>* (**Fig. 17 B-G**).



**Figura 17.** Produção de citocinas nos pulmões de camundongos após infecção com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para Casp11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 Casp11+/+, Casp11+/– e Casp11-/– controle da mesma ninhada. Os animais foram infectados por via intranasal com 2x104 SARS-CoV-2 por camundongos por 3 dias e as citocinas IL-1 $\beta$  (A), IFN $\gamma$  (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), TNF $\alpha$  (F) e MCP-1 (G) foram avaliados em homogeneizado de tecido pulmonar por CBA Mouse Inflammatory Cytokine Kit (BD) seguindo as

instruções. \* P < 0,05, conforme determinado Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn. A caixa mostra a média ± SD dos valores.

### 4.8. A CASP11 prejudica o "clearance" viral em camundongos infectados com SARS-CoV-2

Apesar de não termos observado alguma diferença na carga viral no pulmão de animais deficientes para CASP11 com 3 dias pós infecção (**Fig. 18 A-B**), observamos uma redução na carga viral na ausência de caspase-11 5 dias após a infecção, demonstrando que a CASP11 prejudica parcialmente o *clearance* viral mais tardio (**Fig. 18 A-B**).



Figura 18. A CASP11 prejudica o *clearance* viral em camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 *Casp11<sup>+/+</sup>*, *Casp11<sup>+/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>* controle da mesma ninhada. Os animais foram infectados via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por 5 dias. A carga viral foi avaliada por TCID50 (A) e por RT-PCR para o gene SARS-CoV-2 N2 (B). \* P < 0,05, conforme determinado Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn. A caixa mostra a média ± SD dos valores.

### 4.9. A CASP11 medeia a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-2

Em seguida, investigamos o efeito da CASP11 no desenvolvimento da doença e observamos que os camundongos *Casp11<sup>-/-</sup>* foram protegidos da perda de peso em comparação com os "little mate controls" *Casp11<sup>+/+</sup>* e *Casp11<sup>+/-</sup>* (**Fig. 19 A**). Camundongos *Casp11<sup>-/-</sup>* também foram mais resistentes à variação de temperatura (**Fig. 19 B**) e demonstraram um menor escore clínico durante o desenvolvimento da doença (**Fig. 19 C-D**). Dados similares de proteção com menor escore clínico foram observados em animais hACE-2 *NIrp3<sup>-/-</sup>* (**Fig. 19 C**), demonstrando que a ativação do inflamassoma de NLRP3 via CASP11 é importante para o desenvolvimento da doença nesses animais.

Para avaliarmos a inflamação pulmonar em camundongos infectados com SARS-CoV-2, realizamos análises histológicas dos pulmões infectados. Ao avaliarmos os tecidos pulmonares corados com H&E, observamos a redução do infiltrado celular inflamatório em camundongos *Casp11<sup>-/-</sup>*, que também possuíram área de parênquima reduzida em comparação com camundongos *Casp11<sup>+/+</sup>* infectados após 5 dias de infecção (**Fig. 19 E-F**). Resultados semelhantes foram obtidos em análises histológicas de camundongos infectados por 3 dias (**Fig. 20**). Animais hACE-2 *NIrp3<sup>-/-</sup>* infectados também demonstraram uma menor área do parênquima, com um menor infiltrado inflamatório assim como os animais deficientes para CASP11 quando comparados aos animais hACE-2 WT infectados (**Fig. 22 D - E**)

Além de avaliarmos o infiltrado celular inflamatório, buscamos investigar o perfil de citocinas produzidas nos pulmões de animais  $Casp11^{-/-}$  infectados quando comparados aos animais  $Casp11^{+/+}$  e  $Casp11^{+/-}$  "little mate controls". Observamos que houve uma redução significativa da produção das citocinas IFN $\gamma$ , IL-10, TNF e MCP-1 na ausência de CASP11, corroborando com a redução do infiltrado inflamatório e com o menor desenvolvimento da doença (**Fig. 21 C**).

Em seguida, investigamos a mortalidade dos camundongos durante o desenvolvimento da doença. Inicialmente, monitoramos camundongos por até 10 dias após a infecção e identificamos que camundongos infectados com SARS-CoV-2 começaram a morrer no dia 6 e os animais *Casp11<sup>-/-</sup>* foram significativamente mais resistentes à morte em comparação com *Casp11<sup>+/+</sup>* e *Casp11<sup>+/-</sup>* "little mate controls"

(Fig. 19 G). Esta figura mostra um conjunto de 2 experimentos independentes com n=23 *casp11*<sup>+/+</sup>; n=16 *casp11*<sup>+/-</sup>; n=28 *Casp11*<sup>-/-</sup>. Como no 10° dia pós infecção alguns camundongos permaneceram doentes, decidimos realizar experimentos mais longos. Após a sobrevivência dos camundongos por até 16 dias após a infecção, confirmamos que os animais *Casp11*<sup>-/-</sup> foram significativamente mais resistentes do que os animais *Casp11*<sup>+/+</sup>. Enquanto os animais *Casp11*<sup>+/+</sup> morreram no dia 8, animais *Casp11*<sup>+/-</sup> morreram no 14° dia e cerca de 30% dos animais *Casp11*<sup>-/-</sup> sobreviveram e não apresentaram sinais de doença (**Fig. 19 H**). Esses dados *in vivo* sugerem que a CASP11 participa da exacerbação da doença e pode contribuir para a inflamação excessiva observada nos pulmões de casos críticos de COVID-19. Estes são os primeiros dados que demonstram a ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta ao SARS-CoV-2 em modelos de COVID-19 em camundongos e, mais importante, mostra que o CASP11 é necessária para a ativação eficiente do inflamassoma nos pulmões desses camundongos.



Figura 19. CASP11 contribui para a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 Casp11<sup>+/+</sup>, Casp11<sup>+/-</sup> e Casp11<sup>-/-</sup> controle da mesma ninhada. Os animais foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por até 10 dias. Variação de peso corporal (A), variação de temperatura (B) e escore clínico (C) foram avaliadas do dia 0 ao dia 10. Escore clínico até 3 e 5 dias pós-infecção de um pool de 3 experimentos independentes (D). (E) A porcentagem da área do parênguima foi estimada após coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de tecidos pulmonares de animais K18-hACE2 Casp11<sup>+/+</sup>, Casp11<sup>+/-</sup> e Casp11<sup>-/-</sup> infectados por 5 dias. As barras mostram a média ± SD dos valores. São demonstradas imagens representativas de pulmões corados com H&E de camundongos infectados por 5 dias (F). Os painéis superiores mostram camundongos infectados por Mock. Barra de escala 50 µm. (G) Curva de sobrevivência de K18-hACE2 Casp11<sup>+/+</sup> (n=23), Casp11<sup>+/-</sup> (n=16) e Casp11<sup>-/-</sup> (n=28) infectados e seguidos por 10 dias (2 experimentos independentes). (H) Curva de sobrevivência de K18-hACE2 Casp11+/+ (n=3), Casp11+/-(n=8) e Casp11<sup>-/-</sup> (n=13) infectados e acompanhados por 16 dias (\* nesta figura indica P < 0,05 comparando Casp11<sup>+/+</sup> com Casp11<sup>-/-</sup>).\*, P < 0,05, conforme determinado pelo teste de Man Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-Wallis (para 3 grupos) (A-D) ou Kaplan-Meier (G-H).



Figura 20. A CASP11 agrava a patologia da doença, avaliada por análises histológicas de pulmões de camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 *Casp11<sup>-/-</sup>* e controles de ninhada. Os animais foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por por 3 dias. (A) A porcentagem da área do parênquima foi estimada após coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de cortes pulmonares de K18-hACE2 *Casp11<sup>-/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>* infectados por 3 dias. As barras mostram a média ± SD dos valores. Imagens representativas de pulmões corados com H&E de camundongos infectados por 3 dias (B). Os painéis superiores mostram camundongos tratados com sobrenadante da vero, grupo "Mock". Barra de escala 50 µm. \*, P < 0,05, conforme determinado pelo teste de Man Whitney.



Figura 21. Produção de citocinas nos pulmões de camundongos 5 dias após a infecção com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2 *Casp11<sup>+/+</sup>*, *Casp11<sup>+/-</sup>* e *Casp11<sup>-/-</sup>* controles da mesma ninhada. Os animais foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por 5 dias e as citocinas IL-1β (A), IFNγ (B), IL-6 (C), IL-10 (D), IL-12 (E), TNFα (F) e MCP-1 (G) foram avaliados em homogenato pulmonar por CBA Mouse Inflammatory Cytokine Kit (BD) seguindo as instruções. \* P < 0,05, conforme determinado Kruskal-Wallis seguido pelo teste post hoc de Dunn. A caixa mostra a média ± SD dos valores.





Figura 22. CASP11 e NLRP3 contribuem para a patologia da doença em camundongos infectados com SARS-CoV-2. Camundongos transgênicos K18-hACE2 heterozigotos para CASP11 foram cruzados para gerar camundongos K18-hACE2  $Casp11^{+/+}$ ,  $Nlrp3^{-/-}$  e  $Casp11^{-/-}$  controle da mesma ninhada (A). Os animais foram infectados por via intranasal com 2x10<sup>4</sup> SARS-CoV-2 por camundongos por até 5 dias. A porcentagem da área do parênquima foi estimada após coloração com hematoxilina e eosina (H&E) de seções pulmonares de K18-hACE2  $Casp11^{+/+}$ ,  $Casp11^{+/-}$  e  $Casp11^{-/-}$  infectados por 5 dias. As barras demonstram a média  $\pm$  SD dos valores. São mostradas imagens representativas de pulmões corados com H&E de camundongos infectados por 5 dias (B). \*, P < 0,05, conforme determinado pelo teste de Man Whitney (para 2 grupos) ou Kruskal-Wallis (para 3 grupos).

#### 4.10. O inflamassoma de NLRP3 está ativo em pacientes com COVID-19

Em seguida, testamos a ativação do inflamassoma no soro de pacientes com COVID-19. Testamos soros obtidos no dia da hospitalização de 124 pacientes com COVID-19 e comparamos com soros de 42 controles que testaram RT-PCR/sorologia negativo ou que foram coletados antes da pandemia da COVID-19. Encontramos concentrações mais altas de Casp1p20 e IL-18 no soro dos pacientes com COVID-19 (**Fig. 23 A, B**), sugerindo que o inflamassoma está ativo nesses pacientes.

Também observamos que as citocinas IL-6, IL-10 e IL-4 estavam aumentadas em pacientes em comparação com os controles. Por outro lado, não detectamos diferenças significativas para as citocinas IL-2, TNF-α e IL-17A (**Fig. 24 C** e **Fig. 24 D**-**E**). Os níveis de IFN-γ foram ligeiramente mais baixos em pacientes com COVID-19 em comparação com os controles (**Fig. 24 C**).

Em seguida, medimos a ativação do inflamassoma em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de 47 pacientes e os comparamos com 32 indivíduos saudáveis. Usando o ensaio FAM-YVAD (FLICA) que é um marcador para caspase-1 intracelular ativa (ZAMBONI et al., 2006), identificamos que, no dia da hospitalização, os PBMCs de pacientes possuem uma porcentagem maior de células FAM-YVAD+ em comparação com controles saudáveis (**Fig. 23 D-E**).

Ainda em PBMCs isolados de pacientes com COVID-19, evidenciamos a presença de "puncta" de NLRP3 e ASC nessas células, indicando a ativação do inflamassoma nesses pacientes (**Fig. 23 F-I**). Para confirmarmos a ativação da caspase-1 nessas células, usamos um ensaio de luminescência e observamos a presença da caspase-1 ativa em sobrenadantes de culturas de PBMCs de 46 pacientes, quando comparada à baixa ativação da caspase-1 em doadores saudáveis (**Fig. 23 J**). Também detectamos IL-1β nos sobrenadantes de PBMCs de alguns pacientes, mas não no sobrenadante de doadores saudáveis (**Fig. 23 K**), reforçando que há ativação do inflamassoma em PBMCs de pacientes com COVID-19.



**Figura 23.** Ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19. (A-C) Concentração de citocinas no soro de indivíduos controles (CT, n = 42 para ELISA e 45 para CBA) e pacientes com COVID-19 (COVID-19 P, n = 124 para ELISA e 92 para CBA; todos testados positivos usando RT-PCR). Caspase-1 ativa (Casp1p20, A) e IL-18 (B) foram medidas por ELISA, e IL-6 (C) foi mensurada 87

por CBA. Dados mostrados como concentrações transformadas em Log10 em pg/mL. (D-I) Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas de sangue fresco de CT ou COVID-19 P. (D-E) PBMCs FAM-YVAD positivos foram estimados por FACS usando kit FLICA Caspase-1. (D) Os histogramas representativos de um CT representativo e um COVID-19 P indicam a "gate" para determinação da porcentagem de células FAM-YVAD+. (E) A porcentagem de células FAM-YVAD+ para 32 CT e 47 COVID-19 P. (F) PBMCs de COVID-19 P foram corados com anti-NLRP3 (verde) para determinação de "puncta" de NLRP3 (setas branças) e DAPI para colorir os núcleos das células (azul). A inserção (vermelho) mostra uma ampliação maior de uma célula contendo "puncta" de NLRP3. Barra de escala de 10 µm. (G) A porcentagem de células com "puncta" de NLRP3 é mostrada para 24 CT e 17 COVID-19 P. (H) PBMCs de COVID-19 P foram corados com anti-ASC (verde) para determinação de "puncta" de ASC (seta branca). DAPI cora os núcleos das células (azul). Inserto (vermelho) mostra uma ampliação da imagem mostrando uma célula contendo "puncta" de ASC. Barra de escala = 10 µm. (I) A porcentagem de células com "puncta" de ASC é mostrada para 35 CT e 18 COVID-19 P. (J) PBMCs de 18 CT e 46 COVID-19 P foram mantidos em cultura por 16 horas e os sobrenadantes foram testados para a atividade de caspase- 1 usando o ensaio Caspase-Glo 1. (K) PBMCs de 6 CT ou 18 COVID-19 P foram mantidos em cultura por 16 horas e a produção de IL-16 foi estimada por ELISA. \* P <0.05, conforme determinado pelo teste t de Student. Cada ponto representa o valor de um único indivíduo. Os dados mostrados em (E, G, I, J, K) resultam de vários experimentos que foram agrupados para gerar as figuras. Barras correspondem à média ± DP dos valores.



**Figura 24. Produção de citocinas em pacientes com COVID-19.** Concentração de citocinas no soro de indivíduos controles (CT, n = 45) e pacientes COVID-19 (COVID- 19 P, n = 92; todos testados positivos usando RT-PCR). (A – E) IL-10 (A), IL-4 (B), IFN- $\gamma$  (C), TNF- $\alpha$  (D) e IL-17A (E) foram medidos por CBA. Os dados são mostrados como Log10 concentrações transformadas em picogramas por mililitro. \*, P <0,05 conforme determinado pelo teste t de Student. Cada ponto representa o valor de um único indivíduo. A caixa mostra a média ± DP dos valores. ns, não significativo.

#### 4.11. A CASP4 é regulada positivamente e ativada em pacientes com COVID-19

A fim de investigarmos a regulação da expressão de CASP4 em pacientes com COVID-19, avaliamos dados de sequenciamento de RNA de swab nasofaríngeo de controles e de doadores saudáveis (n = 10) e pacientes com COVID-19, incluindo 58 que testaram positivo para o vírus (não hospitalizados), 17 que foram internados, mas não necessitaram de UTI e 8 que foram internados em unidade de terapia intensiva (UTI) (Ng et al., 2021). A expressão de CASP4 foi significativamente maior em pacientes com COVID-19 quando comparado aos controles, independentemente do grau de gravidade da doença (**Fig. 25 A, B**). Os genes associados ao inflamassoma, como membros da família CASP1, IL1B e IL-18 (IL18, IL18R1, IL18RA) também foram regulados positivamente e correlacionados positivamente com CASP4 em pacientes com COVID-19 (**Fig. 25 B-D**).

No entanto para confirmarmos a ativação de caspase-4 em pacientes moderados e graves, obtivemos PBMCs de 9 doadores saudáveis (HC1 - HC9) e 13 pacientes COVID-19 com COVID-19 (P1 - P13) e testamos a clivagem de CASP4 por western blot. Detectamos uma heterogeneidade na clivagem de CASP4 em PBMCs obtidos de pacientes com COVID-19 (em 7 de um total de 13 pacientes testados) (**Fig. 25 E**).



**Figura 25. CASP4 é regulado positivamente em pacientes com COVID-19.** (A-D) A expressão de CASP4 foi avaliada em amostras de swab nasofaríngeo de controles e de pacientes com COVID-19 divididos em três grupos: Não hospitalizados; Hospitalizado, não UTI; e UTI (A). A expressão de CASP4 foi correlacionada com outros genes relacionados ao inflamassoma (B). Correlação CASP4 com CASP1 (C) e IL1B (D) em pacientes divididos em: não hospitalizados; Hospitalizados, não UTI; e UTI. (E) Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs) foram isoladas de sangue fresco de Controles Saudáveis (HC 1-9, n=9) ou COVID-19 P (P1-13, n=13). A clivagem de CASP4 foi avaliada por análise de Western blotting do lisado celular.

### 4.12. O inflamassoma de NLRP3 está ativo em tecidos *post mortem* de pacientes com COVID-19

Após avaliarmos a expressão de genes do inflamassoma na cavidade nasofaríngea e a sua ativação em células mononucleares circulantes do sangue, buscamos avaliar a ativação do inflamassoma em tecidos pulmonares obtidos de autópsias de pacientes com COVID-19 que foram a óbito. Inicialmente, utilizamos um anticorpo anti-SARS-CoV-2 para a confirmação da presença do vírus por coloração de imuno-histoquímica em tecidos pulmonares *post-mortem* (**Fig. 26 A**, **B**).

Posteriormente, realizamos a coloração multiplex por imunohistoquímica sequencial com anti-SARS-CoV-2, anti-CD14 e anti-NLRP3 e identificamos células CD14+ infectadas que expressam NLRP3 em tecidos *post-mortem* de pacientes (**Fig. 26 C, D**).

No entanto, para confirmação da ativação do inflamassoma e não somente da sua expressão aumentada, avaliamos a quantidade de "puncta" de NLRP3 e de ASC nos pulmões de 5 controles e 5 pacientes com COVID-19 utilizando microscopia confocal e identificamos que os pacientes possuem maior número de "puncta" de NLRP3 (Fig. 26 E) e de ASC (Fig. 26 F) em comparação com os controles. Imagens representativas de tecidos pulmonares corados com anticorpo anti-NLRP3 (Fig. 26 G) ou anti-ASC (Fig. 26 H) ilustram a formação de "puncta", indicando que existem inflamassomas ativos em casos letais de COVID-19.



**Figura 26.** Análise histopatológica pulmonar e ativação de NLRP3 em casos fatais de COVID-19. Achados histológicos pulmonares representativos em paciente com COVID-19 (COVID-19 P), autopsiado por autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom. (A, B) Imagem imunohistoquímica representativa de tecidos de controle (CT, A) ou COVID-19 P (B) corados com anti-SARS-CoV-2. Barra de escala 50 µm. (C-D) A coloração multiplex por coloração imunohistoquímica sequencial com setas anti-SARS-CoV-2, anti-CD14 e anti-NLRP3 indica células CD14 + infectadas que expressam NLRP3.

Barra de escala = 20  $\mu$ m (C) e 10  $\mu$ m (D). (E, F) Quantificação de "puncta" de NLRP3 (E) ou "puncta" de ASC (F) em tecidos pulmonares de 5 CT e 5 COVID-19 P. (G, H) Microscopia multifotônica de tecidos pulmonares corados com anti-NLRP3 (G) ou anti-ASC (H) mostrando "puncta" (vermelho, indicado por uma seta preta). As inserções (vermelho) mostram uma ampliação maior de uma célula contendo "puncta" de NLRP3 (G) e de ASC (H). DAPI cora os núcleos das células (azul). Barra de escala= 10  $\mu$ m. Cada ponto nas figuras representa o valor obtido de cada paciente. \* P <0,05, conforme determinado pelo teste t de Student.

### 4.13. A CASP4 é regulada positivamente nos pulmões de casos letais de COVID-19 e se correlaciona com mediadores inflamatórios e componentes do inflamassoma

Por fim, avaliamos a expressão de CASP4 e mediadores inflamatórios em autópsias pulmonares de casos letais de COVID-19. Ao realizar RT-PCR, identificamos que a CASP4 é regulada positivamente nos pulmões de pacientes com COVID-19 (n = 28) em comparação com pacientes controles (área benigna de adenocarcinoma de pulmão, n = 4) (**Fig. 27 A**). É interessante notar que muitos pacientes não apresentaram expressão de CASP4, indicando que a expressão e ativação de CASP4 é variável entre os pacientes com COVID-19. Todos os 28 pacientes mostrados nesta figura apresentaram hemocultura negativa, sugerindo que as coinfecções bacterianas ou fúngicas podem não contribuir para o aumento da expressão de CASP4 observada nos pacientes.

Interessantemente, as análises de RT-PCR da expressão gênica em pacientes com cultura negativa com COVID-19 mostraram uma correlação positiva entre CASP4 e vários genes inflamatórios (**Fig. 27 B**). Entre esses, encontramos uma correlação positiva significativa com CASP1, IL1B, IL18, IL6 e TNFA (**Fig. 27 C-F**).

Ao realizarmos a marcação sequencial de imunoperoxidase e o método chamado SIMPLE ("Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing") que nos permitiu apagar e remarcar lâminas dos tecidos pulmonares, confirmamos a expressão das proteínas CASP4, CASP1 e Spike de SARS-CoV-2 nos pulmões de pacientes fatais com COVID-19 (**Fig. 27 H**).



Figura 27. A CASP4 é regulada positivamente nos pulmões de casos letais de COVID-19 e se correlaciona com mediadores inflamatórios e proteínas associadas ao inflamassoma. Autópsias pulmonares foram obtidas de 28 casos fatais de COVID-19 que testaram negativo para co-infecções

(hemocultura) durante a hospitalização. Os controles incluem amostras de 4 pacientes que faleceram devido a adenocarcinoma de pulmão (área benigna dos pulmões). (A-F) A expressão de mRNA de CASP4 e outros genes inflamatórios foram avaliados em autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19 por RT-PCR. (B) Matriz de correlação da expressão do gene CASP4 e outros genes inflamatórios indicando correlação forte positiva (vermelho), correlação moderada positiva (laranja) e correlação fraca positiva (amarelo). (C-F) Correlações de CASP4 com CASP1 (C), IL-18 (D), IL-6 (E) e TNF (F). (G) A coloração multiplex por coloração imuno-histoquímica sequencial ilustra a expressão de CASP4 (anti-CASP4). Expressão de CASP1 (anti-CASP1) e proteína Spike SARS-CoV-2 (anti-Spike) no tecido pulmonar de um paciente com COVID-19. Barra de escala 20 µm.

Análises adicionais, incluindo amostras de pacientes com COVID-19 que testaram positivo para fungos ou bactérias durante a hospitalização, não demonstraram uma contribuição significativa de coinfecções para o aumento da expressão de CASP4 (**Fig. 28**).



Figura 28. A expressão aumentada de CASP4 em tecidos pulmonares de autópsia de pacientes com COVID-19 ocorre independentemente de co-infecções bacterianas e fúngicas. As autópsias pulmonares obtidas de casos fatais de COVID-19 foram distribuídas de acordo com a presença ou ausência de coinfecções conforme determinado por hemocultura durante a internação. Os pacientes com COVID-19 incluem 28 que testaram negativo para co-infecções, 4 co-infectados com bactérias Gram-positivas, 9 co-infectados com bactérias Gram-negativas e 2 co-infectados com fungos. Os dados que mostram 28 que testaram negativo para co-infecções. A expressão de mRNA de CASP4 foi avaliada por RT-PCR. As barras mostram a média ± SD dos valores.

#### 4.14. A ativação do inflamassoma influencia no resultado clínico da COVID-19

Em seguida, avaliamos o impacto da ativação do inflamassoma no desenvolvimento clínico da doença. Inicialmente, realizamos análises dos níveis de Casp1p20 e IL-18 no soro obtido no dia da internação de 124 de pacientes. Realizamos uma matriz de correlação de Pearson para avaliar vários parâmetros. Essas análises foram realizadas em R para gerarmos a matriz de correlação e a função corrplot para a exibição gráfica da matriz de correlação. Observamos uma correlação positiva dos níveis de Casp1p20 e/ou IL-18 com marcadores inflamatórios, como proteína C reativa (PCR), LDH e ferritina (Fig. 29 A). Observamos uma correlação positiva entre os níveis de Casp1p20 e IL-18, sugerindo que a produção de IL-18 é de fato dependente do inflamassoma (Fig. 29 B). Além disso, a presença de Casp1p20 se correlacionou positivamente com IL-6, LDH e com proteína C reativa (CRP) (Fig. 29 C-E). Observamos também que os níveis de IL-18 se correlacionaram positivamente com os níveis de IL-6 e PCR (Fig. 29 F, G). Também avaliamos se os níveis de Casp1p20 e IL-18 seriam afetados pela presença de comorbidades ou pelos parâmetros clínicos dos pacientes, incluindo coinfecções bacterianas (bactérias cultiváveis no sangue), nefropatia, obesidade, gênero, acidente vascular cerebral, pneumopatia, imunodeficiência e neoplasia (Fig. 30). Detectamos diferenças estatisticamente significativas apenas guando comparamos pacientes obesos com não obesos, pois os níveis de IL-18 foram maiores em pacientes com índice de massa corporal > 30 (Fig. 30 G). Também analisamos os pacientes de acordo com o número de comorbidades e não detectamos diferenças significativas nos níveis de Casp1p20 e IL-18 de acordo com o número de comorbidades dos pacientes (Fig. 30 T, -U).

Posteriormente, investigamos se os níveis de Casp1p20 e IL-18 medidos no dia da hospitalização se correlacionavam com o desfecho clínico da doença. É importante notar que os níveis de IL-18, mas não de Casp1p20, foram mais elevados em pacientes que necessitaram de ventilação mecânica (VM) em comparação com os pacientes que não necessitaram (**Fig. 29 H, I**). Quando separamos os pacientes de acordo com a gravidade da doença (leve/moderada *versus* grave), descobrimos que os níveis de Casp1p20, mas não os níveis de IL-18, eram maiores em pacientes com a forma grave da COVID-19 (**Fig. 29 J, K**) Também observamos que os níveis de IL-18, mas não de Casp1p20, foram maiores nos casos letais de COVID-19 em comparação com os sobreviventes (**Fig. 29 L, M**). Por fim, realizamos análises longitudinais da produção de IL-18 e Casp1p20 em 37 pacientes a partir do dia da

hospitalização (dia zero) por até 45 dias após a admissão usando modelos mistos generalizados com distribuição 'gama' e função de ligação 'log' como a melhor previsão do conjunto de dados. Para essas análises, categorizamos os pacientes em: óbito, recuperação leve (pacientes que foram hospitalizados, mas não necessitaram de VM e se recuperaram) e recuperação crítica (pacientes que necessitaram de VM na Unidade de Terapia Intensiva e se recuperaram). Para Casp1p20, o modelo indicou um efeito significativo no dia zero, que diminuiu com o tempo, independentemente do sexo ou desfecho clínico do paciente (**Fig. 29 N**). Já em relação a IL-18, o modelo de melhor ajuste também descreveu uma redução geral na produção de IL-18 ao longo do tempo (amostragem do dia), que diferiu entre os grupos de pacientes. Este modelo previu uma diminuição na IL-18 em taxas semelhantes entre os três grupos, com pacientes que morreram apresentando níveis mais elevados que nunca atingiram os observados em pacientes com recuperação leve e recuperação crítica (**Fig. 29 O**), reforçando nossa afirmação que a magnitude da ativação do inflamassoma impacta no resultado da doença.

Os resultados que demonstraram níveis elevados de Casp1p20 em pacientes, juntamente a presença de "puncta" de NLRP3 e ASC em células de pacientes PBMCs e em tecidos *post mortem*, fortalecem a nossa afirmação de que os inflamassomas são ativos em pacientes com COVID-19 e isso pode afetar o desfecho clínico da doença.



**Figura 29. A ativação do inflamassoma influencia no resultado clínico da COVID-19.** (A) Matriz de \correlação dos níveis de Casp1p20 e IL-18 no soro de pacientes com COVID-19 no dia da internação com as características do paciente e parâmetros clínicos. (BJ) Correlações de Casp1p20 com IL-18 (B), Casp1p20 com IL-6 (C), Casp1p20 com lactato desidrogenase (LDH) (D), Casp1p20 com proteína C reativa (PCR), IL-18 com IL-6 (F) e IL-18 com PCR (G). (H, I) Níveis de Casp1p20 (H) e IL-18 (I) em pacientes que necessitaram (VM +, barra azul) ou não (VM-, barra vermelha) de ventilação mecânica.

(J, K) Níveis de Casp1p20 (J) e IL-18 (K) em pacientes com COVID-19 Leve/Moderado (barra amarela) ou Grave (barra rosa). (L, M) Níveis de Casp1p20 (L) e IL-18 (M) em sobreviventes (barra verde) ou não sobreviventes (barra roxa). Os níveis de Casp1p20 e IL-18 foram medidos por ELISA e são mostrados como concentrações transformadas em Log10. \* P <0,05 e \*\* P <0,01 conforme determinado pelo teste t de Student. Cada ponto representa o valor de um único indivíduo. Barras correspondem à média ± DP dos valores. (N, O) Predições derivadas dos modelos de melhor ajuste retidos nas análises longitudinais de Casp1p20 (N) e IL-18 (O); O modelo compreende a variação na interceptação entre os grupos de pacientes: Morte (vermelho), Recuperação crítica (laranja) e Recuperação leve (azul).



Figura 30. Associação da ativação do inflamassoma com características clínicas e comorbidades. (A) Correlação de matriz dos níveis de Casp1p20 e IL-18 em o soro de pacientes com COVID-19 no dia da internação com parâmetros clínicos e comorbidades. (B – S) Níveis de Casp1p20 (B, D, F, H, J, L, N, P e R) e IL-18 (C, E, G, I, K, M, O, Q e S) em pacientes com parâmetros clínicos como bactérias cultiváveis no sangue (B e C), nefropatia (Nefr .; D e E), obesidade (F e G), gênero (H e I), acidente vascular cerebral (AVC; J e K), pneumopatia (Pneum .; L e M), imunodeficiência (Imuno.; N e O), neoplasia (Neopl .; P e Q), e tabagismo (Tabag.; R e S). (T e U) Níveis de Casp1p20 (T) e IL-18 (U) no soro de pacientes com COVID-19 associados ao número de comorbidades dos pacientes, variando de nenhuma comorbidade (0) a mais de cinco comorbidades (+5). Os níveis de Casp1p20 e IL-18 foram medidos por ELISA e são mostrados como concentrações transformadas por Log10 em picogramas por mililitro. \*, P <0,05 conforme determinado pelo teste t de Student (G, P = 0,0054). Cada ponto representa um valor de um único indivíduo. A caixa mostra a média ± DP dos valores. B.C., hemocultura; DM, diabetes mellitus; DAI, doenças autoimunes; HAS, hipertensão arterial sistêmica; AVC, acidente vascular cerebral; IDD, imunodeficiência; ns, não significativo.

# Discussão

### 5. DISCUSSÃO

Em resumo, nosso trabalho demonstrou que a infeção pelo SARS-CoV-2 é capaz de induzir a ativação do inflamassoma de NLRP3 via CASP4/CASP11 em monócitos humanos e macrófagos murinos infectados *in vitro*. Também demonstramos que a CASP4/11 participa da ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta ao SARS-CoV-2 e promove a exacerbação da doença em modelo de camundongos K18-hACE2, que são permissivos a infecção (ZHENG et al., 2021). Corroborando com os dados *in vitro* e *in vivo*, identificamos que o inflamassoma é fortemente ativo em pacientes com COVID-19 que requerem hospitalização e tanto a magnitude da ativação do inflamassoma no dia da hospitalização quanto o curso da ativação do inflamassoma durante a hospitalização influenciam no desfecho clínico da doença. Nossos resultados explicam efetivamente a fisiopatologia da COVID-19 e estabelecem que a CASP4 pode ser um alvo terapêutico para tratar pacientes em condições moderadas e críticas. Esses dados encorajam estudos futuros para direcionar inflamassomas como estratégias terapêuticas para COVID-19.

Sabia-se que pacientes com COVID-19 grave apresentavam um aumento de IL-1 $\beta$  e IL-18 circulantes (LUCAS et al., 2020). No entanto, não estava clara a participação do inflamassoma nesse processo e se o SARS-CoV-2 induziria essa ativação de forma direta. Inicialmente, realizamos experimentos *in vitro* e observamos que o SARS-CoV-2 induz a ativação do inflamassoma de NLRP3 observada através da presença de "puncta" em monócitos humanos, além da liberação de caspase-1 ativa e de IL-1 $\beta$ . Dados semelhantes foram publicados posteriormente, com monócitos e/ou macrófagos humanos infectados *in vitro* caracterizados por maior indução de caspase-1 e IL-1 $\beta$  (FERREIRA et al., 2021; SEFIK et al., 2022). Portanto, confirmamos a ativação e participação do inflamassoma na indução de IL-1 $\beta$  e passamos a investigar melhor a importância no inflamassoma para o desenvolvimento da doença.

Dados de ASC "speck" aumentados frente a infecção por SARS-CoV-2 *in vitro* em monócitos humanos mesmo após a inibição de NLRP3 através da utilização do MCC950 sugerem que há a ativação de outros inflamassomas dependentes de ASC. Junqueira e colaboradores demonstraram posteriormente que monócitos infectados com SARS-CoV-2 morrem por piroptose mediada por GSDMD através da ativação dos inflamassomas de NLRP3 e AIM2 demonstrados em um único "puncta" (JUNQUEIRA et al., 2022). Portanto, esses dados em conjunto apontam que o SARS-CoV-2 é capaz de ativar não somente o inflamassoma de NLRP3, mas também o inflamassoma de AIM2 em humanos.

Além de observarmos o aumento dos componentes do inflamassoma "dawnstream" de NLRP3, como a presença de ASC "speck" nas células infectadas e de CASP1 e IL-1 $\beta$  no sobrenadante das mesmas, também encontramos a maior expressão e ativação de CASP4 (em humanos), análoga a CASP11 (em camundongos), que caracteriza a ativação não canônica do inflamassoma de NLRP3 (KAYAGAKI et al., 2011). Até então existem poucos trabalhos que associam a ativação da CASP4 com a ativação não canônica do inflamassoma em infecções virais. Um destes trabalhos demonstrou que a CASP4 é ativada em resposta a infecção pelo vírus DENV2, causador da dengue, induzindo a ativação do inflamassoma e produção de IL-1 $\beta$  e piroptose em macrófagos infectados (CHEUNG et al., 2018). Com isso, esclarecemos que, assim como outros vírus, o SARS-CoV-2 pode induzir a ativação de CASP4 em células humanas, ativando a via não canônica do inflamassoma.

De modo similar ao que ocorre em monócitos, também observamos a ativação do inflamassoma em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDMs) infectados com SARS-CoV-2. Recentemente, foi demonstrado que a ativação do inflamassoma em BMDMs infectados com SARS-CoV-2 é dependente da replicação viral, uma vez que o tratamento com remdesivir leva a perda da produção de IL-18/IL-1β (SEFIK et al., 2022). Com isso, acreditamos que o vírus replica nessas células e ativa o inflamassoma de NLRP3.

Nos BMDMs infectados *in vitro* com SARS-CoV-2 também há a ativação de CASP11, a qual foi importante para a ativação do inflamassoma de NLRP3 e para a produção de IL-1β nessas células. No entanto, ainda não identificamos a molécula indutora da ativação da CASP11, seja uma proteína viral ou uma molécula endógena, constituindo uma limitação do nosso estudo. Uma das formas endógenas descritas de ativação da CASP11 ocorre pelo reconhecimento de fosfolipídios oxidados (ZANONI et al., 2016). Outros trabalhos demonstram que moléculas como o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (HAGAR et al., 2013; KAYAGAKI et al., 2011; ZANONI et al., 2016) assim como lipofosfoglicano (LPG) em parasitas são potentes ativadores da CASP11 (DE CARVALHO et al., 2019). Dado que essas moléculas que são reconhecidas e

ativam CASP11 podem variar de acordo com o patógeno, experimentos estão em andamento para identificarmos a molécula responsável pela ativação de CASP4/11 durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

Existem algumas proteínas virais que atuam na regulação das respostas imunes. Por exemplo, a NSP5 é uma protease do SARS-CoV-2 capaz de clivar RIG-I e MAVS, inibindo assim a produção de IFNβ via RIG-I, e, consequentemente, a resposta antiviral (LIU et al., 2021). Em relação a ativação do inflamassoma, foi evidenciado que a proteína N do SARS-CoV-2 interage diretamente com a proteína NLRP3, promovendo a ligação de NLRP3 com ASC e induzindo respostas inflamatórias excessivas em animais infectados *in vivo* (PAN et al., 2021).

Um estudo descreveu que a morte celular piroptótica que ocorre após a infecção de macrófagos pelo SARS-CoV-2 via receptores CD16 e ACE-2 impede um ciclo viral produtivo nessas células (SEFIK et al., 2022). No nosso trabalho, identificamos que a morte celular lítica de monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 ocorreu de maneira independente do inflamassoma de NLRP3. Logo, acreditamos que vias alternativas de morte celular independentes de NLRP3 podem operar em resposta a infecção.

Para entendermos se de fato a morte celular pode acontecer por outra via não piroptótica e, portanto, independente do inflamassoma, ou se essa morte celular lítica ocorreria por meio da ativação de outros inflamassomas, avaliamos macrófagos deficientes para várias moléculas envolvidas com a piroptose, necroptose, apoptose e autofagia. A morte celular ocorreu mesmo na ausência de componentes de qualquer uma das vias investigadas. Corroborando com a possibilidade de haver mais de um tipo de morte celular induzida pelo vírus, foi demonstrado recentemente que a ativacao de caspase-8 em células pulmonares Calu-3 infectadas *in vitro* desencadeia um processo de morte celular dupla por apoptose e por necroptose para a liberação de IL-1β (LI et al., 2020b). Posteriormente, também foi sugerido que o SARS-CoV-2 seria capaz de induzir uma morte chamada panoptose, que consiste no conjunto das mortes celulares apoptose, necroptose e piroptose acontecendo concomitantemente (ZHENG et al., 2020). Com esses dados concluímos que o SARS-CoV-2 é capaz de orquestrar uma morte celular por diversas vias distintas.

Embora já esteja bem estabelecida a importância do IFN-I para o controle da replicação viral, animais hACE-2 deficientes para IFNAR possuem diferenças mínimas

na replicação de SARS-CoV-2 quando comparados aos animais hACE-2 WT (ISRAELOW et al., 2020). No entanto, a ausência da sinalização de IFN-I pode implicar em maior ativação do inflamassoma e produção de IL-18 em macrófagos infectados (FLAMENT et al., [s.d.]). Já foi previamente descrito que o IFN $\beta$  pode regular negativamente tanto a produção de pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 como das suas formas maduras, IL-1 $\beta$  e IL-18, através da regulação dos inflamassomas de NLRP3 e NLRP1b. Assim, embora o IFN $\beta$  seja bastante utilizado no tratamento de doenças inflamatórias, essa citocina pode enfraquecer o sistema imune após uma infecção viral (GUARDA et al., 2011). Observamos no nosso estudo que uma das formas de regulação negativa da ativação do inflamassoma durante a infecção por SARS-CoV-2 ocorre via IFN do tipo I, pois há um aumento de IL-1 $\beta$  na ausência da sinalização de IFN-I em BMDMs *Ifnar*<sup>-/-</sup>. Dessa forma, demonstramos que esse antagonismo das vias de IFN $\beta$  e do inflamassoma também ocorre frente a infecção por SARS-CoV-2.

Neste trabalho geramos camundongos K18-hACE-2, que expressam ACE-2 humanizada na região promotora do gene da queratina 18, presente em células epiteliais, como um modelo experimental permissivo a infecção pelo SARS-CoV-2. Esses animais K18-hACE-2 foram cruzados com os animais deficientes para moléculas do inflamassoma, o que nos permitiu investigar a importância dessas moléculas na fisiopatologia da COVID-19. Este foi o primeiro trabalho a utilizar animais deficientes para componentes do inflamassoma em um "background" K18-hACE-2. Através desse modelo, observamos que os níveis de IL-18 estavam reduzidos no pulmão de animais *Casp11<sup>-/-</sup>* de modo semelhante ao encontrado em animais *NIrp3<sup>-/-</sup>*, *Casp1/Casp11<sup>-/-</sup>* e *Asc/Casp11/Casp11<sup>-/-</sup>*, demonstrando a importância da CASP11 na ativação do inflamassoma mediante a infecção por SARS-CoV-2 nesses animais. A partir de então, focamos na investigação da importância da CASP11, que estaria acima de NLRP3, ASC e CASP1.

De modo similar ao que observamos *in vitro*, resposta de ativação do inflamassoma pelo SARS-CoV-2 também se mostrou dependente de CASP11 *in vivo*, caracterizada pela menor formação de "puncta" de NLRP3 e "puncta" de ASC no pulmão dos animais *Casp11<sup>-/-</sup>* infectados, associada a menores níveis de IL-18 e IL-1β, confirmando que há a ativação não canônica de NLRP3 induzida pela infecção. Esta é a primeira evidência da importância da CASP11 para a ativação do NLRP3 *in vivo* em infecção por SARS-CoV-2.
Outro achado importante deste trabalho foi a participação da CASP11 na fisiopatologia e maior gravidade da doença em animais K18-hACE-2 infectados com SARS-CoV-2. Demonstramos que os animais Casp11<sup>-/-</sup> possuíram um menor infiltrado inflamatório pulmonar nos dias 3 e 5 após a infecção, com redução de citocinas inflamatórias no pulmão, além de um escore clínico reduzido e uma diminuição da variação de peso e temperatura, indicando um menor grau de doença. Recentemente, foi demonstrada a participação da CASP4/11 na indução da inflamação e coagulopatia em pacientes COVID-19 grave. Neste trabalho, também foi observado que os animais deficientes para Casp11-/- infectados com SARS-CoV-2 MA-10 tiveram um menor acúmulo do fator de von Willebrand, um marcador de dano endotelial, mas apresentaram uma maior expressão do fator de transcrição chamado "Krupel-Like" 2, o qual é responsável por manter a integridade vascular (ELTOBGY et al., 2022). Em contrapartida, nossos achados não incluem relação entre os pacientes com maior expressão de CASP4 a presença de coagulopatia. A partir dessas informações, confirmamos que a CASP11 é importante para a resposta inflamatória pulmonar exacerbada e desenvolvimento da doença em resposta a infecção pelo SARS-CoV-2.

Dados similares de proteção foram obtidos em camundongos deficientes para *NIrp3<sup>-/-</sup>*, que possuíram área do parênquima reduzida e menor desenvolvimento da doença. Corroborando com nossos dados, um estudo demonstrou que a inibição do inflamassoma de NLRP3 através do uso de MCC950 reduziu a inflamação pulmonar excessiva em camundongos hACE-2 infectados com SARS-CoV-2 (ZENG et al., 2022). Com isso, concluímos que o NLRP3 contribui para a inflamação pulmonar e agravamento da doença nos animais infectados com SARS-CoV-2.

É interessante observar que a CASP11 somente interferiu na replicação viral nos tecidos pulmonares 5 dias após a infecção. Contrariamente, outro grupo de pesquisa não observou diferença na replicação viral até o 4º dia pós infecção utilizando uma carga viral maior em um modelo de infecção com vírus murino (10<sup>5</sup> PFU SARS-CoV-2 MA-10) (ELTOBGY et al., 2022). Já foi previamente relatado que o pico de replicação viral ocorre no 2º dia pós infecção com queda nos dias seguintes (OLADUNNI et al., 2020) . Portanto, sugerimos que a CASP11 pode facilitar o *clearance viral* por mecanismos que ainda necessitam ser melhor investigados e essa resposta depende da carga viral e do modelo experimental utilizado.

Além de avaliarmos a ativação do inflamassoma em resposta a infecção por SARS-CoV-2 *in vitro* e *in vivo*, buscamos investigar a ativação do inflamassoma em pacientes com COVID-19. Identificamos que que componentes do inflamassoma estão expressos e/ou ativos em diversas células e tecidos, como na nasofaringe, no pulmão e nos PBMCs dos pacientes com COVID-19. Observamos a presença de "puncta" de NLRP3 nos PBMCs de pacientes moderados e graves, assim como a caspase-1 estava ativa nessas células. Recentemente, foi publicado que os monócitos de pacientes com COVID-19 foram mais responsivos a P-selectina e ao fibrinogênio e passaram a secretar maiores níveis de citocinas inflamatórias. Este trabalho identificou que a interação entre monócitos e plaquetas foi crucial para a ativação de citocinas inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  (HOTTZ et al., 2022). Portanto, concluímos que há a ativação do inflamassoma em células mononucleares circulantes dos pacientes com COVID-19 e as plaquetas podem favorecer essa resposta.

Evidenciamos que o SARS-CoV-2 desencadeou uma potente resposta transcricional CASP4/11. É possível que a atividade relatada das proteínas "Spike" ou do envelope (E) de SARS-CoV-2 na sinalização TLR2/NF- $\kappa$ B seja responsável por esse processo (KHAN et al., 2021; ZHENG et al., 2021). Alternativamente, as citocinas produzidas em resposta à infecção viral, como IL-6 e TNF $\alpha$ , podem desencadear a sinalização de NF- $\kappa$ B que, por sua vez, promove a expressão de CASP4/11. Independentemente do mecanismo pelo qual o SARS-CoV-2 desencadeia a regulação transcricional de CASP4/11, esse processo foi consistentemente observado em infecções de macrófagos *in vitro*, em amostras nasofaríngeas de pacientes com COVID-19 e nos pulmões de casos fatais de COVID-19.

Embora tenhamos observado o aumento da expressão de componentes do inflamassoma na nasofaringe de pacientes com COVID-19 hospitalizados e não hospitalizados. Neste estudo, não testamos pacientes assintomáticos para ativação do inflamassoma, mas pode-se esperar que os níveis de Casp1p20 e IL-18 sejam intermediários entre indivíduos não infectados e pacientes leves/moderados. Não podemos excluir que seja possível que a ativação do inflamassoma em pacientes assintomáticos e leves seja benéfica para o hospedeiro e possa ser responsável por respostas protetoras do hospedeiro contra o vírus, em oposição ao efeito prejudicial

do inflamassoma em gerar inflamação exacerbada em pacientes com formas graves de doença.

É interessante notar que, embora ocorra de maneira heterogênea, houve a ativação de CASP4 nos PBMCs dos pacientes moderados e graves. Buscando avaliar se também haveria ativação do inflamassoma nos pulmões infectados, identificamos uma maior quantidade de "puncta" de NLRP3 e ASC em autopsias de pulmão de pacientes com COVID-19. Corroborando com esses dados, outro estudo identificou a presença do inflamassoma de NLRP3 ativo no pulmão de casos fatais de COVID-19 (TOLDO et al., 2021). Posteriormente, nosso grupo demonstrou que a ativação do inflamassoma de NLRP3 no pulmão dos pacientes ocorre principalmente em macrófagos e em células endoteliais (DE SÁ et al., [s.d.]). Através desses achados, concluímos que o inflamassoma está se encontra ativo no pulmão de pacientes que foram a óbito por COVID-19.

Para entendermos a relação da ativação do inflamassoma com a gravidade da doença, avaliamos os níveis de CASP1 e IL-18 no soro de 124 pacientes e identificamos que os produtos derivados do inflamassoma, como Casp1p20 e IL-18 correlacionaram-se com os marcadores de gravidade de COVID-19, incluindo IL-6 e LDH. A IL-18 já havia sido associada a casos graves (LUCAS et al., 2020), mas não havia sido correlacionada com outras moléculas do inflamassoma ou com LDH, que também foi bastante discutido como um biomarcador de gravidade nesses pacientes (WU et al., 2020). Assim, confirmados que existe uma associação entre a ativação do inflamassoma com a morte celular lítica e, possivelmente, com a gravidade da doença nesses pacientes.

A seguir, demonstramos que os níveis de IL-18 se encontraram elevados em pacientes que necessitaram de ventilação mecânica e nos que não sobreviveram. Além disso, em um estudo longitudinal, os níveis de IL-18 no dia de hospitalização dos pacientes que eventualmente vão a óbito são maiores quando comparados aos pacientes que se recuperam. Em concordância com nossos dados, um estudo recente também encontrou níveis aumentados de IL-18 em pacientes com COVID-19 grave. Em resumo, os autores observaram uma mudança no perfil de monócitos e macrófagos que deixaram de produzir IFNα e passavam a produzir IL-18 nos pacientes com COVID-19. Níveis elevados de IL-18 induziram a ativação de células T invariantes de mucosa (MAIT) que passaram a ter um perfil citotóxico, contribuindo

para a inflamação pulmonar e morte dos pacientes graves (FLAMENT et al., [s.d.]). A partir desses achados em conjunto, compreendemos melhor os possíveis mecanismos de indução da inflamação pulmonar causada pela IL-18 e sugerimos que esta citocina poderia ser utilizada como um biomarcador para indicativo da progressão da doença.

Com relação a comorbidades associadas a COVID-19, observamos que os níveis de IL-18 foram maiores nos pacientes obesos com COVID-19 quando comparados aos infectados não obesos. Trabalhos já demonstraram que adipócitos humanos expressam e secretam IL-18 (SKURK et al., 2005; WOOD et al., 2005). Além disso, os níveis de IL-18 foram encontrados aumentados no plasma de pacientes obesos, devido a resistência a insulina e não necessariamente ao peso corporal (BRUUN et al., 2007). Portanto, identificamos que a obesidade é mais um fator que contribui para o aumento de IL-18 nos pacientes com COVID-19.

Para alguns parâmetros, detectamos diferenças estatisticamente significativas em IL-18, enquanto em outros, as diferenças foram identificadas em Casp1p20. A produção da IL-18 de modo independente da CASP1 já foi descrita (SUGAWARA et al., 2001; TSUCHIYA et al., 2014) e, portanto, não podemos excluir completamente a possibilidade de que uma via independente do inflamassoma possa ser responsável pela produção elevada de IL-18 em pacientes com COVID-19. No entanto, esta hipótese não é suportada por nossos dados, que mostram uma correlação significativa entre IL-18 e Casp1p20 em soros de COVID-19.

Nossos resultados demonstrando níveis elevados de Casp1p20 em pacientes, juntamente com a demonstração de "puncta" de NLRP3 e ASC em PBMCs de pacientes e em tecidos de autopsias apoiam fortemente nossa afirmação de que os inflamassomas são ativos em pacientes com COVID-19 e se correlacionam com o desfecho da COVID-19. No entanto, apesar de termos identificado moléculas chave do inflamassoma responsáveis pela exacerbação da inflamação, no presente estudo não investigamos a fundo uma estratégia terapêutica específica para pacientes com COVID-19 grave. Recentemente, nosso grupo identificou a niclosamida como um potente inibidor da ativação do inflamassoma e da replicação do SARS-CoV-2, constituindo um forte inibidor tanto da replicação viral como da resposta inflamatória mediada pelo inflamassoma (DE ALMEIDA et al., 2022). Esse estudo forneceu informações sobre os mecanismos imunomoduladores desse fármaco que se mostrou

altamente promissor e está atualmente em ensaios clínicos de fase I para o tratamento da COVID-19.

Portanto, sugerimos que o inflamassoma pode ser utilizado como alvo terapêutico potencial em pacientes com COVID-19 moderada e grave e como biomarcadores indicativos do desfecho clínico na doença, especialmente através da dosagem de IL-18.

# Sumário

## 6. SUMÁRIO

**6.1.** Há ativação do inflamassoma em monócitos humanos infectados com SARS-CoV-2 *in vitro*.

**6.2.** A CASP4 (em humanos) e a CASP11 (em camundongos) são ativas e importantes para a ativação não canônica do inflamassoma de NLRP3 em monócitos humanos e macrófagos murinos infectados com SARS-CoV-2 *in vitro*.

**6.3.** A morte celular ocorre em monócitos humanos e macrófagos murinos resposta a infecção pelo SARS-CoV-2 mesmo na ausência do inflamassoma de NLRP3.

**6.4.**O SARS-CoV-2 induz a morte celular em BMDMs mesmo na ausência de GSDMD, caspase-7, caspase-8 e RIPK3, sugerindo que o vírus é capaz de ativar vias alternativas distintas de morte celular.

**6.5.** A sinalização de IFN-I regula negativamente a ativação do inflamassoma em macrófagos murinos infectados *in vitro*.

**6.6.**A CASP11 participa da ativação do inflamassoma de NLRP3 em animais *Casp11*<sup>+/+</sup>, *Casp11*<sup>+/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup> infectados com SARS-CoV-2 *in vivo*.

**6.7.** A CASP11 contribui para a fisiopatologia e para o desenvolvimento da doença em animais *Casp11*<sup>+/+</sup>, *Casp11*<sup>+/-</sup> e *Casp11*<sup>-/-</sup> infectados com SARS-CoV-2 *in vivo*.

**6.8.** A expressão de CASP4 e outros componentes do inflamassoma está aumentada em amostras de swab de nasofaringe e tecido pulmonar pacientes com COVID-19 e pode estar ativa em células mononucleares periféricas do sangue de pacientes moderados e graves.

**6.9.**O inflamassoma de NLRP3 é ativo pulmão de pacientes que foram a óbito com COVID-19 e no sangue de pacientes moderados e graves.

6.10. A ativação do inflamassoma se correlaciona com a magnitude da doença.

# Conclusão

### 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, identificamos a CASP4/CASP11 como uma molécula importante para a ativação do inflamassoma de NLRP3 em resposta a infecção pelo SARS-CoV-2. Nossos dados obtidos com amostras de pacientes com COVID-19 e infecções *in vitro* com monócitos humanos e macrófagos murinos foram reforçados por experimentos *in vivo* realizados com camundongos ACE-2 humanizados infectados com SARS-CoV-2. Assim, demonstramos que a CASP11 e o NLRP3 contribuem para inflamação pulmonar exacerbada e para desenvolvimento da doença, contribuindo para a melhor compreensão da patogênese da COVID-19 (**Figura 31**).

Interessantemente, a IL-18 mostrou-se um potencial biomarcador indicativo de desfecho clínico ruim da doença, com níveis significativamente elevados desde o primeiro dia de hospitalização dos pacientes que chegaram a óbito quando comparada aos pacientes que se recuperam. Já a CASP1 foi encontrada em níveis significativamente elevados nos pacientes graves quando comparada aos pacientes leves e moderados no dia de hospitalização, porém não variou de acordo com desfecho da doença. Portanto, nossos resultados sugerem que a magnitude da ativação do inflamassoma tanto no dia da internação quanto o curso da ativação do inflamassoma durante a hospitalização influenciam o resultado clínico dos pacientes.

Como o inflamassoma de NLRP3 é central em pacientes críticos com COVID-19, estratégias imunomoduladoras que tenham o NLRP3 como alvo podem aumentar as possibilidades terapêuticas para tratar casos críticos de COVID-19. Logo, uma abordagem clínica que iniba os alvos que estão acima dos produtos da ativação do inflamassoma, tais como a CASP4 ou o próprio NLRP3, pode ser mais promissora do que bloqueio apenas a sinalização da IL-1β, estratégia que já vem sido testada em pacientes com COVID-19(CAVALLI et al., 2020; HUET et al., 2020). Nesse cenário, a determinação dos mecanismos específicos pelos quais o SARS-CoV-2 desencadeia a ativação do inflamassoma e a compreensão de quais plataformas específicas do inflamassoma são ativadas durante a doença também são informações importantes para estratégias terapêuticas eficazes para o COVID-19.



Desfecho clínico ruim

Figura 31. Participação do inflamassoma no desenvolvimento da COVID-19. A infecção pelo SARS-CoV-2 leva a ativação de CASP4/CASP11 e do inflamassoma de NLRP3 em monócitos e macrófagos isolados, em camundongos e em humanos. A ativação do inflamassoma culmina na produção de IL-1 $\beta$  e IL-18, piroptose, contribuindo para a resposta inflamatória exacerbada, que favorece o desfecho clínico ruim dos pacientes moderados e graves com COVID-19.

# Referências Bibliográficas

### 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHAZZANI, W. et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 5, 2020.

AMANAT, F.; KRAMMER, F. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. ImmunityCell Press, , 14 abr. 2020.

BAKER, P. J. et al. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2918–2926, 1 out. 2015.

BANERJEE, I. et al. Gasdermin D Restrains Type I Interferon Response to Cytosolic DNA by Disrupting Ionic Homeostasis. **Immunity**, v. 49, n. 3, p. 413- 426.e5, 18 set. 2018.

BARTON, K.; BARTON, M. K. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. **Version**, v. 1, n. 1, 2020.

BASTARD, P. et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 2020.

BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036- 1045.e9, 28 maio 2020.

BROOKS, M. E. et al. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. **R Journal**, v. 9, n. 2, 2017.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. Nature Reviews ImmunologyNature Publishing Group, , 1 jul. 2016a.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. Nature Reviews ImmunologyNature Publishing Group, , 1 jul. 2016b.

BRUUN, J. M. et al. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: Effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. **European Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 4, p. 465–471, out. 2007.

BURKE, T. P. et al. Inflammasome-mediated antagonism of type I interferon enhances Rickettsia pathogenesis. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 688–696, 1 maio 2020. CAVALLI, G. et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. **The Lancet Rheumatology**, v. 2, n. 6, p. e325–e331, 1 jun. 2020.

CAVALLI, G. et al. Interleukin-1 and interleukin-6 inhibition compared with standard management in patients with COVID-19 and hyperinflammation: a cohort study. **The Lancet Rheumatology**, v. 3, n. 4, p. e253–e261, 1 abr. 2021.

CHANG, S. E. et al. New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.

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**, v. 19, n. 2, 2016.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 1 maio 2020a.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 1 maio 2020b.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020c.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020d.

CHEUNG, K. T. et al. Involvement of caspase-4 in IL-1 beta production and pyroptosis in human macrophages during dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 223, n. 4–5, p. 356–364, 1 abr. 2018.

CHI, Y. et al. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 5, p. 746–754, 1 set. 2020a.

CHI, Y. et al. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 5, p. 746–754, 1 set. 2020b.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews MicrobiologyNature Publishing Group, , 1 mar. 2019a.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews MicrobiologyNature Publishing Group, , 1 mar. 2019b.

CUNHA, L. D. et al. Inhibition of inflammasome activation by Coxiella burnetii type IV secretion system effector IcaA. **Nature Communications**, v. 6, 21 dez. 2015.

DE ALMEIDA, L. et al. Identification of immunomodulatory drugs that inhibit multiple inflammasomes and impair SARS-CoV-2 infectionSci. Adv. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.science.org">https://www.science.org</a>>.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. Leishmania Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 429- 437.e5, 8 jan. 2019.

DE SÁ, G. et al. Inflammasome activation and pulmonary viral loads define two distinct clinical outcomes in COVID-19. [s.d.].

DE WIT, E. et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. Nature Reviews MicrobiologyNature Publishing Group, , 1 ago. 2016a.

DE WIT, E. et al. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. Nature Reviews MicrobiologyNature Publishing Group, , 1 ago. 2016b.

DELOREY, T. M. et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. **Nature**, v. 595, n. 7865, 2021.

ELTOBGY, M. M. et al. Caspase-4/11 exacerbates disease severity in SARS-CoV-2 infection by promoting inflammation and immunothrombosis. 2022.

FERREIRA, A. C. et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, 1 jun. 2021.

FLAMENT, H. et al. Outcome of SARS-CoV-2 infection linked to MAIT cell activation and cytotoxicity: 1 evidence for an IL-18 dependent mechanism 2 Authors. [s.d.].

FOUCHIER, R. A. M. et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0400762101>.

FRANKE, C. et al. High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in COVID-19 patients with neurological symptoms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 93, 2021. GOLDSMITH, C. S. et al. Ultrastructural Characterization of SARS Coronavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, 2004.

GUAN, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. **Science**, v. 302, n. 5643, 2003.

GUARDA, G. et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 213–223, 25 fev. 2011.

GUTHERY, F. S.; BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. **The Journal of Wildlife Management**, v. 67, n. 3, 2003.

HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, 2020.

HAGAR, J. A. et al. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: Implications in TLR4independent endotoxic shock. **Science**, v. 341, n. 6151, p. 1250–1253, 2013.

HAN, Y. et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: A retrospective and observational study. **Aging**, v. 12, n. 12, p. 11245–11258, 30 jun. 2020.

HARTIG, F. DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical Regression Models. **The Comprehensive R Archive Network**, 2020.

HAUENSTEIN, A. V.; ZHANG, L.; WU, H. The hierarchical structural architecture of inflammasomes, supramolecular inflammatory machines. Current Opinion in Structural BiologyElsevier Ltd, , 1 abr. 2015.

HE, X. et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, 2020.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3
Inflammasome Activation. Trends in Biochemical SciencesElsevier Ltd, , 1 dez.
2016.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 16 abr. 2020.

HOTTZ, E. D. et al. Platelet-monocyte interaction amplifies thromboinflammation through tissue factor signaling in COVID-19. **Blood Advances**, v. 6, n. 17, p. 5085–5099, 13 set. 2022.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020a.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020b.

HUET, T. et al. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study. **The Lancet Rheumatology**, v. 2, n. 7, p. e393–e400, 1 jul. 2020.

ISRAELOW, B. et al. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type i interferon signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 4 ago. 2020. JUNQUEIRA, C. et al. FcyR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates

inflammation. Nature, v. 606, n. 7914, p. 576–584, 16 jun. 2022.

KANEKO, N. et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, 2020.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–121, 3 nov. 2011.

KHAN, S. et al. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-κB pathway. **eLife**, v. 10, 1 dez. 2021.

KURIAKOSE, T.; KANNEGANTI, T.-D. **Pyroptosis in Antiviral Immunity**. [s.l: s.n.]. LAM, T. T. Y. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, 2020.

LAUER, S. A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 9, p. 577–582, 5 maio 2020.

LEGRAND, C. et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. **Journal of Biotechnology**, v. 25, n. 3, 1992.

LEVI, M. et al. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. The Lancet Haematology, 2020.

LI, L. et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients with Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial.

JAMA - Journal of the American Medical Association, v. 324, n. 5, 2020a.

LI, S. et al. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2020b.

LI, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, 2003.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, 2020.

LIU, Y. et al. SARS-CoV-2 Nsp5 Demonstrates Two Distinct Mechanisms Targeting RIG-I and MAVS To Evade the Innate Immune Response. 2021.

LIVANOS, A. E. et al. Intestinal Host Response to SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Outcomes in Patients With Gastrointestinal Symptoms. **Gastroenterology**, v. 160, n. 7, 2021.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, 5 dez. 2014. LU, G. et al. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26. **Nature**, v. 500, n. 7461, p. 227–231, 2013.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020a.

LU, X. et al. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1654–1665, 1 ago. 2020b.

LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020.

LÜDECKE, D. ggeffects: Tidy Data Frames of Marginal Effects from Regression Models. **Journal of Open Source Software**, v. 3, n. 26, p. 772, 29 jun. 2018.

MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, 2020.

MERAD, M. et al. **The immunology and immunopathology of COVID-19**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.science.org">https://www.science.org</a>>.

MERAD, M. et al. **The immunology and immunopathology of COVID-19**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <a href="https://www.science.org">https://www.science.org</a>>.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. Nature Reviews ImmunologyNature Research, , 1 jun. 2020.

MICHEL, C. J. et al. Characterization of accessory genes in coronavirus genomes. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, 27 ago. 2020.

NALLA, A. K. et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. 2020.

OLADUNNI, F. S. et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

PAN, P. et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. Severe acute respiratory syndrome. Nature Medicine, 2004.

PERICO, L. et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. Nature Reviews Nephrology, 2021.

PERLMAN, S.; DANDEKAR, A. A. Immunopathogenesis of coronavirus infections: Implications for SARS. Nature Reviews Immunology, dez. 2005a.

PERLMAN, S.; DANDEKAR, A. A. Immunopathogenesis of coronavirus infections: Implications for SARS. Nature Reviews Immunology, dez. 2005b.

POGGIALI, E. et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 509, p. 135–138, 1 out. 2020.

QIAN, Z. et al. Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 48, n. 6, p. 742–748, jun. 2013.

RAJ, V. S. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 251–254, 14 mar. 2013.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, 1938.

REUSKEN, C. B. E. M. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: A comparative serological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 10, 2013.

RISSO, D. et al. GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, 17 dez. 2011.

ROBB, J. A.; BOND, C. W.; LEIBOWITZ, J. L. Pathogenic murine coronaviruses III. Biological and biochemical characterization of temperature sensitive mutants of JHMV. **Virology**, v. 94, n. 2, 1979. 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**, v. 218, n. 3, 2020.

RÜHL, S.; BROZ, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K+ efflux. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2927–2936, 1 out. 2015.

SCHMID-BURGK, J. L. et al. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2911–2917, 1 out. 2015.

SCHULTE-SCHREPPING, J. et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, 2020.

SCOBEY, T. et al. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 40, p. 16157–16162, 1 out. 2013.

SEFIK, E. et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. **Nature**, v. 606, n. 7914, p. 585–593, 16 jun. 2022.

SHI, J.; GAO, W.; SHAO, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. Trends in Biochemical Sciences Elsevier Ltd, , 1 abr. 2017.

SILVIN, A. et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 6, 2020.

SKURK, T. et al. The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes. **European Journal of Endocrinology**, v. 152, n. 6, 2005.

SUGAWARA, S. et al. Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6568–6575, 1 dez. 2001.

SUN, J. et al. Prolonged persistence of SARS-CoV-2 RNA in body fluids. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 8, 2020.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nature Reviews Immunology, 2019.

TYRRELL, D. A. J. et al. Coronaviridae1Intervirology. [s.l: s.n.].

TANG, N. et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 4, 2020.

THACHIL, J. et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 5, 2020.

TOLDO, S. et al. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. **Inflammation Research**, v. 70, n. 1, p. 7–10, 1 jan. 2021.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nature Reviews Immunology, 2010.

TSUCHIYA, K. et al. The adaptor ASC exacerbates lethal Listeria monocytogenes infection by mediating IL-18 production in an inflammasome-dependent and - independent manner. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 12, p. 3696–3707, 1 dez. 2014.

WANG, E. Y. et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. **Nature**, v. 595, n. 7866, 2021.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, dez. 2005a.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, dez. 2005b.

WEN, W. et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2020.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. JAMA - Journal of the American Medical AssociationAmerican Medical Association, , 25 ago. 2020a.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. JAMA - Journal of the American Medical AssociationAmerican Medical Association, , 25 ago. 2020b. WÖLFEL, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, 2020.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, abr. 2012.

WOOD, I. S. et al. The pro-inflammatory cytokine IL-18 is expressed in human adipose tissue and strongly upregulated by TNFα in human adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, 2005.

WU, M. Y. et al. Clinical evaluation of potential usefulness of serum lactate dehydrogenase (LDH) in 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. **Respiratory Research**, v. 21, n. 1, 6 jul. 2020.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, v. 323, n. 13, 2020.

YAMADA, T. et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, 2021.

YIN, X. et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. **Cell Reports**, v. 34, n. 2, 2021.

ZAMBONI, D. S. et al. The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, p. 318–325, mar. 2006.

ZANONI, I. et al. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. **Science**, v. 352, n. 6290, p. 1232–1236, 3 jun. 2016.

ZENG, J. et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. **eBioMedicine**, v. 75, p. 103803, 2022.

ZENG, Z. et al. Longitudinal changes of inflammatory parameters and their correlation with disease severity and outcomes in patients with COVID-19 from Wuhan, China. **Critical Care**, v. 24, n. 1, 27 ago. 2020.

ZHANG, Q. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with lifethreatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 2020. ZHENG, M. et al. Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 41, p. 14040–14052, 9 out. 2020.

ZHENG, M. et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, p. 829–838, 1 jul. 2021.

ZHOU, R. et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, 2020.

ZUO, Y. et al. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 570, 2020.

## Anexos

### 9. ANEXOS

#### 9.1 Anexo 1: Prêmios e títulos

**9.1.1.** Menção honrosa pela participação do Prêmio Thereza Kipnis com apresentação intitulada "inflammasomes are activated in response to sars-cov-2 infection and are associated with covid-19 severity in patients", realizada durante o XLV Encontro anual da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2021.

**9.1.1.** Palestra intitulada "INFLAMMASOME ROLE IN THE PATHOGENESIS OF SARS-COV-2 INFECTION IN HUMANS AND ANIMAL MODELS" no Simpósio SBBf Young Scientists no 51th Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) e 46th Congress of the Brazilian Society of Biophysics (SBBf)/LAFESB que ocorreu entre os dias 5 e 8 de Setembro no Centro de Convenções do Hotel Majestic em Águas de Lindóia, SP

**9.1.2.** Menção honrosa pela participação do Prêmio Thereza Kipnis com apresentação intitulada "Inflammasomes are activated in response to sars-cov-2 infection and are associated with covid-19 severity in patients", realizada durante o XLV Encontro anual da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2021.

**9.1.3.** Menção honrosa a Tamara Silva Rodrigues pela aula ministrada "Doenças alérgicas: patogênese e terapia", a qual foi classificada em 3º lugar como melhor aula teórica do XI Curso de Inverno em Imunologia, realizado no período de 16 a 25 de julho de 2018.

**9.1.4.** Premiada em primeiro lugar pelo trabalho intitulado "Alveolar epitelial cells role upon dendritic cells function during Mycobacterium tuberculosis infection: active

players or innocent bystandars? No XII Workshop of Immunology, realizado na Fuldade de Medicina de Ribeirão Preto no Período de 22 a 24 de novembro de 2018.

9.2. Anexo 2: Trabalhos de primeira autoria

**9.2.1 Artigo publicado (RODRIGUES et al, JEM, 2020):** Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE., v.218, p.1 - 11, 2020.

**9.2.2 Artigo publicado (SALINA; DOS SANTOS; RODRIGUES et al.,** *eLife***, 2021):** Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage antiinflammatory functions and clearance of apoptotic cells. eLife. v.11, p.74443 - , 2022.

**9.2.3 Artigo em preparação (RODRIGUES et al., Journal of Infectious Disease):** CASP4/11 contributes to pulmonary inflammation and disease exacerbation in COVID-19.

**9.2.4 Artigo publicado (RODRIGUES et al., Journal of Leucocyte Biology, 2019):** Mycobacterium tuberculosis -infected alveolar epithelial cells modulate dendritic cell function through the HIF-1α-NOS2 axis.

**9.2.5 Artigo publicado (RODRIGUES et al., Journal of Leucocyte Biology, 2019):** nterplay between alveolar epithelial and dendritic cells and Mycobacterium tuberculosis.

### 9.3. Anexo 3: Trabalhos de co-autoria

**9.3.1 Artigo publicado (DE CARVALHO et al., Nature Communications, 2019):** Leishmania RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition.

9.3.2 Artigo publicado (DE ALMEIDA et al., Science Advances, 2022):

Identification of immunomodulatory drugs that inhibit multiple inflammasomes and impair SARS-CoV-2 infection.

**9.3.3 Artigo publicado (SILVA et al., Critical Care, 2022):** Gasdermin-D activation by SARS-CoV-2 triggers NET and mediate COVID-19 immunopathology.

**9.3.4 Artigo publicado (LOPES et al., RMD OPEN, 2021):** Beneficial effects of colchicine for moderate to severe COVID-19: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. RMD OPEN.

**9.3.5 Artigo publicado (PALMA et al., Cells, 2021)**: Obesity-Induced Dysbiosis Exacerbates IFN-γ Production and Pulmonary Inflammation in the Mycobacterium tuberculosis Infection.

**9.3.6 Artigo publicado (PIÑEROS et al., 2019):** Obesity-Induced Dysbiosis Exacerbates IFN-γ Production and Pulmonary Inflammation in the Mycobacterium tuberculosis Infection.

### 9.4 Anexo 4: Repercussão deste trabalho no cenário nacional e internacional

Os anexos a seguir se referem à repercussão desse trabalho no cenário nacional e internacional. Como mostrado no anexo 1, os trabalhos resultantes dessa tese foram publicados em periódicos de prestígio internacional, como por exemplo as revistas *Journal of Experimental Medicine (JEM)* e *e-life* e *Journal of Infectious disease (in preparation)*. Além do impacto científico mundial, podemos evidenciar a importância desse trabalho para a ciência nacional, uma vez que os dois artigos resultantes desta tese (RODRIGUES et al., 2020, JEM) e (Rodrigues et al., 2022, in preparation) foram realizados por pesquisadores brasileiros em território nacional e trazem informações

extremamente relevantes sobre a importância do inflamassoma para o desenvolvimento da COVID-19 grave.

Os resultados obtidos nestas publicações implicam em um grande avanço no campo do conhecimento da COVID-19, destacando a comunidade científica brasileira frente ao cenário internacional e nacional. Em 2020, este trabalho foi divulgado por diversos meios de comunicação no Brasil, ressaltando a sua relevância no cenário da COVID-19 e ampliando o acesso a informação o público leigo brasileiro sobre ciência básica.

O reconhecimento aos trabalhos resultantes desta tese fez a aluna participar do Prêmio Thereza Kipnis, que é considerado o maior prêmio de imunologia do país. A aluna também foi convidada para apresentar esses resultados na sessão de "Young Scientists" do congresso anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biofísica (SBBq).

Finalmente, gostaria de evidenciar as perspectivas futuras resultantes desta tese. Os achados deste estudo auxiliaram significativamente na compreensão da imunopatogênese da COVID-19. Acreditamos que esses dados poderão contribuir diretamente para o futuro desenvolvimento de terapias efetivas contra a doença, prevenindo e tratando, principalmente, a COVID-19 grave.