



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

BRUNA RAMOS TOSTA

**IMPACTO DE VARIANTES NO GENE *MTOR* NA GRAVIDADE DA
COVID-19 EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Salvador, BA
2023



BRUNA RAMOS TOSTA

IMPACTO DE VARIANTES NO GENE *MTOR* NA GRAVIDADE DA COVID-19 EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa
Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo.

Salvador, BA
2023



Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T716 Tosta, Bruna Ramos
Impacto de variantes no gene *MTOR* na gravidade da Covid-19 em uma
população brasileira/Bruna Ramos Tosta. – Salvador, 2023.
32 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa; Coorientadora: Prof^a.
Dr^a. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.
Inclui referências.

1. mTOR. 2. Covid-19 - gravidade. 3. SARS-CoV-2. 4. Polimorfismo.
I. Costa, Ryan dos Santos. II. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana de.
III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.9:575

“A todos os participantes dessa pesquisa que possibilitaram a realização desse projeto. A minha avó Dinália, de onde estiver, e a minha Margaridinha, minha mãe que é tudo em minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ryan dos Santos Costa por toda a orientação que tem me concedido desde antes da minha seleção de mestrado e durante todo este processo de aprendizado, por me guiar de forma extremamente competente, ética, firme, paciente e compreensivo em todos os momentos. Sou imensamente agradecida pela sua confiança e incentivo para desenvolver esse projeto.

À Prof^a Dr^a. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo pelo apoio e suporte com o projeto, pelas correções e sugestões, pela atenção e cuidado que tem conosco.

Ao Prof. Dr. Helton Estrela Ramos (Instituto de Ciências da Saúde – UFBA) pelo trabalho no desenho do estudo e também ao Prof. Dr. Fabyan Esberard de Lima Beltrão (UFPB) responsável pelo recrutamento, avaliação clínica e acompanhamento dos pacientes. Agradeço imensamente aos participantes desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Soraya Castro Trindade (UEFS) e ao Prof. Dr. Vitor Antônio Fortuna (UFBA) pela colaboração e sugestões com o projeto. A toda a equipe do LABIMUNO, professores e colegas do PPGIm, as colegas Fabiane, Patrícia, Nívia e Taiane por me auxiliarem e ajudarem sempre que eu precisava.

À Prof^a Dr^a Valdirene Leão Carneiro pela contribuição para o processo de extração de DNA durante o difícil período crítico da pandemia. Às colegas Jéssica Araújo e Juliana Rodrigues por terem se dedicado na extração de DNA dessas amostras.

Aos colegas do Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA), em especial Dr. Eduardo, pela disponibilidade e ajuda com os ELISAs.

Aos meus amigos do IMUNOBIO, agradeço imensamente a cada um por serem tão amigáveis e atenciosos, em especial a Laiane e Raísa por terem me recebido e ajudado de diversas formas desde o início do mestrado. Agradeço a João e Mailane pela dedicação e companheirismo, a Hatila pelo apoio sempre nos perrengues das análises. E a minha companheira de projeto Ingrid por ter abraçado essa jornada firmemente comigo noite e dia, sendo uma peça principal nos momentos mais importantes desta jornada. Obrigada a todos pelo apoio, pelas palavras de incentivo e pelos momentos de alegria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da UFBA - PPGIm por todo o suporte dado durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado que tem sido imprescindível para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, pela concessão do auxílio que financiou os experimentos.

À minha família, e amigos por me ajudarem de diversas formas para que eu continue trilhando o meu caminho. E também aos meus filhos felinos.

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você se lembrar de acender a luz”, Alvo Dumbledore em “Harry Potter e o Prisioneiro de Azkaban”.

RESUMO

Introdução: A pandemia de SARS-CoV-2 causou milhares de mortes em todo o mundo. A gravidade da doença está associada à idade, sexo, comorbidades, e uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada e descontrolada resultante da tempestade de citocinas. As tempestades de citocinas são caracterizadas por uma grande liberação desregulada de citocinas que podem ser desencadeadas por infecções virais e moduladas por várias vias de sinalização. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina treonina quinase capaz de modular a ativação celular e a resposta inflamatória inata das células, que é a primeira linha de defesa contra os vírus. A via mTORC1 mostrou ser afetada pelo SARS-CoV-2 e hiperativa em pacientes graves de COVID-19, o que sugere que a desregulação desta via pode desempenhar um papel importante no mau prognóstico da doença. Além disso, a genética dos pacientes poderia contribuir para esse desfecho. **Objetivos:** Investigar o envolvimento de variantes no gene *MTOR* com a gravidade da COVID-19 na população brasileira. **Métodos:** Indivíduos com COVID-19 grave e leve foram recrutados e amostras de sangue periférico e dados sociodemográficos foram coletados. Os SNVs rs1057079 e rs2536 do gene *MTOR* foram genotipados através de RT-qPCR. Realizamos análise de regressão logística e curvas de sobrevivência Kaplan-Meier. Aplicamos um escore de risco genético para estimar a contribuição cumulativa dos alelos de risco. Os níveis de plasma das citocinas TNF e IL-6 foram medidos através de ELISA e analisados. **Resultados e Conclusões:** O alelo T de rs1057079 foi associado ao risco de gravidade e a COVID-19 crítica, bem como ao aumento dos níveis plasmáticos de TNF. Enquanto isso, o genótipo TT de rs2536 foi associado com o óbito por COVID-19. Os alelos de risco das variantes mostraram um risco cumulativo quando herdados juntos e podem ser úteis para prever um resultado mais grave da COVID-19.

Palavras-chave: mTOR, COVID-19, SARS-CoV-2, gravidade, polimorfismo.

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2's pandemic has caused thousands of deaths worldwide. The disease's severity is associated with age, sex, ongoing comorbidities along with exacerbated and uncontrolled systemic inflammatory response resulting from cytokine storm. Cytokine storms are characterized by a large dysregulated release of cytokines that can be triggered by viral infections and modulated by various signaling pathways. The target protein of rapamycin in mammals (mTOR) is a serine threonine kinase capable of shaping cellular activation and inflammatory innate response of cells, which is the first line of defense against viruses. The mTORC1 pathway has been shown to be affected by SARS-CoV-2 and hyperactivated in COVID-19's severe patients which suggest that dysregulation of this pathway might play an important role in poor prognosis of disease. In addition, the genetic background of patients could possibly contribute to this outcome. **Objectives:** To investigate the involvement of variants in the *MTOR* gene with the severity of COVID-19 in the Brazilian population. **Methods:** Individuals with severe and mild COVID-19 were recruited and peripheral blood samples and sociodemographic data were collected. The SNVs rs1057079 and rs2536 of the *MTOR* gene were genotyped by RT-qPCR. We performed logistic regression analysis and Kaplan-Meier survival curves. We applied a genetic risk score to estimate the cumulative contribution of risk alleles. Plasma levels of the cytokines TNF and IL-6 were measured by ELISA and analyzed. **Results and Conclusions:** The T allele of rs1057079 was associated with risk of severity and critical COVID-19, as well as increased plasma levels of TNF. Meanwhile, the TT genotype of rs2536 was associated with death from COVID-19. The variant risk alleles showed a cumulative risk when inherited together and may be useful in predicting a more severe outcome of COVID-19.

Keywords: mTOR, COVID-19, SARS-CoV-2, severity, polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e entrada do SARS-CoV-2 na célula.....	17
Figura 2. Via PI3K/AKT/mTOR.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Serina-treonina quinase
CI	Intervalo de Confiança
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA2	Enzima conversora de angiotensina II
GENO	Genótipo
GTP	Trifosfato de guanosina
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina 1
IL-1b	Interleucina 1 beta
IgG	Imunoglobulina G
IP10 (CXCL10)	Ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C
ISG	Gene estimulado por IFN
LDH	Lactato desidrogenase
MAF	Frequência do menor alelo
MERS-CoV	Síndrome respiratória do Oriente Médio
MCP-1 (CCL2)	Proteína quimiotática de monócitos 1
MCP-3 (CCL7)	Proteína quimiotática de monócitos-3
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MIP-1a (CCL3)	Proteína inflamatória de macrófago
mSin1	Proteína 1 de interação com MAPK
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Complexo 1 do Alvo da rapamicina em mamíferos
NFkB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Razão de Chances (Odds Ratio)
p70S6K1	Proteína ribossômica p70 S6 quinase 1
PDK1	Quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIKK	Quinase relacionada com fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRAS40	Substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa
Protor ½	Proteína associada a RICTOR 1 ou 2
Raptor	Proteína regulatória associada a mTOR
Rheb	Ras homólogo enriquecido no cérebro
RICTOR	Companheiro insensível à rapamicina
RNA	Ácido ribonucleico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RRPs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV	Coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave
SARSr-CoVs	Coronavírus filogeneticamente relacionados aos SARS-CoV
sIL-2RA	Receptor solúvel de Interleucina 2
SNV	Variantes de Nucleotídeo Único
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TMPRSS2	Protease Serina Transmembranar 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSC1-TSC2	Complexo da esclerose tuberosa 1 e 2
UTI	Unidade de terapia intensiva
VOC	Variantes de preocupação
4E-BP1	Proteína 1 de ligação do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Pandemia de SARS-CoV-2	14
2.2	Coronavírus e a COVID-19	16
2.3	Gravidade da COVID-19 e Aspectos Imunológicos	19
2.4	Evidências <i>mTOR</i> e SARS-CoV-2	22
3	HIPÓTESE E OBJETIVOS	25
3.1	Hipótese	25
3.2	Objetivo Geral	25
3.3	Objetivos Específicos	25
4	Impact of <i>MTOR</i> gene variants on COVID-19 severity in a Brazilian population	Error!
	Bookmark not defined.	
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO GERAL

A COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, tem como sintomas mais comuns a febre, tosse e dispneia em casos leves e moderados (SAXENA et al., 2021). Porém, o que leva essa doença a ser uma grave ameaça global, além da elevada taxa de transmissão, é a evolução clínica, em cerca de 15% dos infectados, para uma forma grave que inclui a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), pneumonia, choque séptico e/ou falência múltipla dos órgãos, podendo resultar em óbitos (CAO, 2020; YE; WANG; MAO, 2020).

Além das associações da gravidade da COVID-19 com idade avançada e comorbidades pré-existentes, como diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade (BLAGOSKLONNY, 2020), vários estudos detectaram uma ‘tempestade de citocinas’ em pacientes graves, que contribui para o agravamento da doença, desenvolvimento da SRAG e falência múltipla dos órgãos, resultando em morte em um curto espaço de tempo (HUANG et al., 2020; LIU et al., 2020; WANG et al., 2020; YE; WANG; MAO, 2020). A tempestade de citocinas é caracterizada como uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada e descontrolada, na qual há grande liberação de citocinas em resposta a infecções virais (LI et al., 2020).

Uma via de sinalização celular que pode estar envolvida nesse processo é a Akt/PI3K/mTOR. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma serina treonina quinase capaz de regular e modular a ativação celular e a resposta inflamatória de células da resposta imune inata que é a primeira linha de defesa contra infecções virais (WEICHHART; HENGSTSCHLÄGER; LINKE, 2015; YE; WANG; MAO, 2020). Estudos recentes mostraram que a via do mTORC1 está hiperativa e associada ao estado crítico da COVID-19 (BLAGOSKLONNY, 2020). É interessante para o vírus a ativação da via Akt/PI3K/mTOR pois possibilitaria uma síntese de proteínas sustentada para promover sua replicação. Assim, semelhante a outros vírus dependentes da via mTOR, a desregulação desta via pode permitir ao SARS-CoV-2 aumentar sua patogenicidade (APPELBERG et al., 2020). Os mecanismos envolvidos na predisposição à COVID-19 grave ainda não estão bem elucidados, e, portanto, mais estudos são necessários para buscar esclarecer os fatores que aumentem o risco à gravidade da COVID-19, que também pode se manifestar entre indivíduos jovens e saudáveis (OVSYANNIKOVA et al., 2020).

Os estudos genéticos podem ser ferramentas importantes para elucidar o porquê de indivíduos específicos desenvolverem a forma grave da doença e outros não. Variantes genéticas presentes nos vírus e nos indivíduos afetados são prováveis fatores que podem estar associados a predisposição à gravidade (OVSYANNIKOVA et al., 2020). Vários estudos de

associação genômica ampla (GWAS) e estudos de genes candidatos investigaram a associação de variações genéticas com os fenótipos clínicos da COVID-19. Entre os *loci* de interesse estão genes que facilitam a entrada do SARS-CoV-2 nas células epiteliais e genes que modulam as respostas imunes inatas e adaptativas (BOUTIN et al., 2021; KARCIOGLU BATUR; HEKIM, 2021; PAIRO-CASTINEIRA et al., 2021; YAO et al., 2021). A investigação do cenário genético na via do mTOR na COVID-19 ainda não foi desvendada até o momento, necessitando de mais pesquisas que explorem essa relação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pandemia de SARS-CoV-2

Em 1968 foi proposto por vários virologistas a descoberta de um novo grupo de vírus até então não identificado: os coronavírus (ALMEIDA; TYRRELL, 1967). Nomeado em razão da sua aparência exterior semelhante a coroa solar (do latim “corona” que significa coroa ou halo), os coronavírus foram encontrados predominantemente em reservatórios animais como morcegos, ratos, galinhas, gatos, camelos e humanos causando infecções respiratórias e intestinais brandas (ALMEIDA; TYRRELL, 1967; PYRC; BERKHOUT; VAN DER HOEK, 2007; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021). Por razão de sua grande variabilidade antigênica, os coronavírus de resfriado comum costumam reinfectar seus hospedeiros, podendo ser a causa de até 15% dos resfriados sazonais se considerado apenas HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 e HCoV-NL63 (KATHRYN V. HOLMES, 1999; MEYERHOLZ; PERLMAN, 2021). O surgimento de endemias de coronavírus não é incomum, principalmente pela capacidade de transmissão zoonótica adquirida por eles (KATHRYN V. HOLMES, 1999; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021). Por causarem infecções médias a graves apenas em indivíduos mais vulneráveis, foram considerados patógenos respiratórios relativamente inofensivos, cenário este que mudou a partir do surto de síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2002 na província de Guangdong na China, causada pelo coronavírus humano SARS-CoV, que resultou em alta morbidade e mortalidade dos infectados e aumentou a atenção das pesquisas aos coronavírus (CUI; LI; SHI, 2019; PYRC; BERKHOUT; VAN DER HOEK, 2007)

Em 2012, após nove anos do fim da epidemia de SARS-CoV, surgiu em Jeddah na Arábia Saudita um novo coronavírus chamado MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) causando uma nova epidemia. Apesar de ter sido menos transmissível, foi mais perigosa, com uma alta taxa de mortalidade de 37% (PYRC; BERKHOUT; VAN DER HOEK, 2007; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021). Entre as semelhanças com o SARS-CoV estão a síndrome respiratória aguda, desta vez associada com insuficiência renal e uma gravidade relacionada a comorbidades subjacentes (KINDRACHUK et al., 2015). As evidências obtidas através de estudos filogenéticos sugerem a origem destes vírus em morcegos, diferindo em seus possíveis reservatórios intermediários que oportunizam a transmissão dos coronavírus aos humanos (CUI; LI; SHI, 2019). Ao longo dos anos, diversos coronavírus filogeneticamente relacionados aos SARS-CoV (SARSr-CoVs) foram identificados em morcegos de várias regiões do planeta, sendo apontado *hot spots* onde se poderia encontrar uma grande diversidade destes

vírus. Um deles, uma caverna em Yunnan, na China, foi descrito por possuir SARSr-CoVs com uma diversidade genética representante de toda a China, e com todos os elementos genéticos necessários para formar o SARS-CoV (CUI; LI; SHI, 2019; GE et al., 2013; HU et al., 2017).

Em dezembro de 2019 foi relatado um surto de pneumonia desconhecida na cidade de Wuhan, na China, sendo a causa determinada, um novo coronavírus com capacidade de causar uma síndrome respiratória aguda grave em humanos, o SARS-CoV-2. Com vários casos sendo exportados para outros países, óbitos confirmados e evidências de transmissão entre humanos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), nomeando a doença causada pelo SARS-CoV-2 como COVID-19 (WHO, 2022b). A pandemia de SARS-CoV-2 afligiu o mundo de forma rápida e alarmante. Dados divulgados através do “*COVID-19 Map*” (Mapa de COVID-19, em português) da *Johns Hopkins University* (2022) mostram que até janeiro de 2023 mais de 668 milhões de casos e 6,7 milhões de óbitos foram registrados ao longo de toda a pandemia. No Brasil, o primeiro caso importado da Itália foi registrado em 26 de fevereiro, o primeiro óbito em 17 de março e a transmissão comunitária decretada em 20 de março de 2020 (CAVALCANTE et al., 2020). Desde então, já foram mais de 36 milhões de casos confirmados e cerca de 696 milhares de óbitos, com maior incidência dos casos no Espírito Santo (32.262 casos/100 mil hab) e a maior taxa de mortalidade no Rio de Janeiro (440,6 óbitos/100 mil hab.). Na região Nordeste, o estado da Paraíba apresentou a maior incidência de casos (17.333 casos/100 mil hab.), e o Ceará a maior mortalidade (305,5 óbitos/100 mil habitantes) (BRASIL, 2023).

Para enfrentar a pandemia, diversas vacinas foram desenvolvidas contra o vírus, desde vacinas com vírus atenuado até vacinas de RNA mensageiro, com o começo da imunização no Brasil ocorrendo em janeiro de 2021 (BRASIL, 2022). As vacinas proveram boa eficácia de proteção contra a infecção por SARS-CoV-2 (cepa de Wuhan) e progressão da doença, no entanto, com a emergência de novas variantes do vírus que conseguem, em diferentes níveis, evadir a imunidade adquirida por uma pré-exposição ou pela imunização, a COVID-19 continua causando vítimas graves e fatais (BRASIL, 2021; ZHANG et al., 2021b).

Na semana final de 2022, 206.944 mil novos casos e cerca de 1.110 óbitos foram notificados, 19,8% do total de casos ocorreram no Nordeste. Nesta região, a Paraíba possui a maior incidência acumulada (17.333 casos/100 mil hab.) e a Bahia ocupa a sexta posição (11.848,50 casos/100 mil hab.). A Paraíba lidera na incidência de novos casos (77.5 casos/100 mil hab.) sendo o maior número de novos registros no município de João Pessoa (Paraíba) (792 novos casos) e o município de Salvador (Bahia) com 1.318 novos casos. A Bahia é o 3º estado com maior taxa de mortalidade

recente (0,5 óbito/100 mil hab.), sendo Salvador o município com maior número de novos registros de óbitos (16 óbitos). Cerca de 19,3% do total de óbitos no Brasil foram no Nordeste (BRASIL, 2023).

2.2 Coronavírus e a COVID-19

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, os Coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*. Esta subfamília foi dividida em 4 gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020; FUNG; LIU, 2019). *Gamma-* e *Deltacoronavírus* possuem um amplo espectro de hospedeiros inclusive aves, enquanto os *Alpha-* e *Betacoronavírus* infectam exclusivamente mamíferos, como os humanos (V'KOVSKI et al., 2021). O SARS-CoV-2 é um betacoronavirus envelopado esférico do subgênero *Sarbecovirus*, caracterizado por possuir uma fita simples de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 30 kbs, entre os maiores genomas virais de RNA conhecidos (DHAMA et al., 2020; KAYODE et al., 2021). O seu genoma é revestido por uma estrutura helicoidal formada por fosfoproteínas de nucleocapsídeo (N), e circundado por uma bicamada lipídica que forma o envelope ao qual contém 3 proteínas estruturais ancoradas: a proteína de espícula (S), membrana (M) e envelope (E) (HARTENIAN et al., 2020; SIU et al., 2008) (Figura 1).

A proteína M, mais abundante, é responsável pela forma viral do envelope, agindo como um organizador central de montagem do vírus. A proteína E apresenta multifunções desde a patogênese, a montagem e liberação celular das partículas virais (DHAMA et al., 2020). A proteína S é uma glicoproteína de fusão homotrimérica de classe I que fica localizada na superfície do vírion conferindo a ele uma aparência de coroa, possui 2 subunidades com funções distintas: S1 e S2 (DHAMA et al., 2020; HARTENIAN et al., 2020). A subunidade S1 possui o domínio de ligação ao receptor (RBD) sendo a sua principal função o ancoramento com o receptor hospedeiro para entrada do vírus na célula, por isso, atua como um fator importante para o tropismo tecidual, na determinação de hospedeiros e na indução da suas respostas imunes (HARTENIAN et al., 2020; LI, 2016). A subunidade S2 medeia a fusão de membranas virais e celulares sendo necessária para a entrada do material genético viral na célula (HARTENIAN et al., 2020) (Figura 1).

A entrada do SARS-CoV-2 na célula ocorre através da ligação da proteína S com a peptidase de superfície celular ECA2 (Enzima conversora de angiotensina II) expressa em células epiteliais alveolares pulmonares, enterócitos do intestino delgado, células endoteliais arteriais

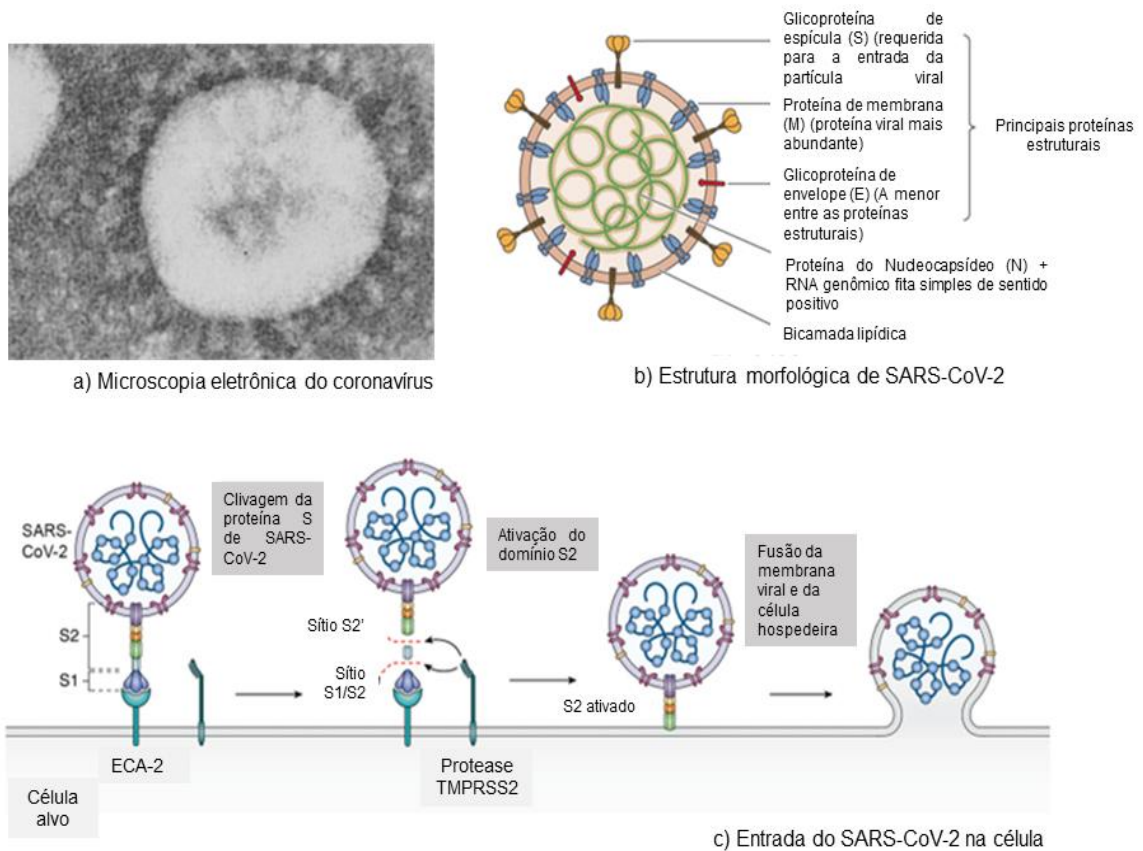


Figura 1. Estrutura e entrada do SARS-CoV-2 na célula. A) Primeira imagem do coronavírus por microscopia eletrônica de coloração negativa. Realizada a partir da inoculação de vírus em culturas de células epiteliais nasais e da traqueia de embriões humanos de 14 a 24 semanas. B) Imagem ilustrativa da estrutura morfológica do SARS-COV-2. C) Esquema ilustrativo do processo de entrada do SARS-CoV-2 na célula. **Fonte:** a) Imagem original de ALMEIDA, J. D & TYRRELL, D. A.J (1967); b) Traduzido de DHAMA et al. (2020); c) Traduzido de HARTENIAN et al. (2020).

e venosas, células musculares lisas arteriais, e vários outros tecidos (HAMMING et al., 2004; HARTENIAN et al., 2020). A subunidade S1 liga-se ao receptor ECA2, e para que sua atividade de fusão seja ativada é necessária a clivagem proteolítica no sítio S1/S2 por uma protease, no caso do SARS-CoV-2 em humanos esse papel é realizado pela TMPRSS2 (Protease Serina Transmembranar 2) (HARTENIAN et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020). Essa clivagem leva a rearranjos conformacionais no domínio S2 encaminhando a um estado de pré-fusão, apenas após uma segunda clivagem, desta vez no sítio S2, que a fusão da membrana viral com a membrana celular é promovida e a entrada do RNA viral para o citoplasma acontece (HARTENIAN et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020; MILLET; WHITTAKER, 2015) (Figura

1). Após a entrada na célula do hospedeiro, o SARS-CoV-2 replica-se abundantemente e é eficientemente transmitido (V'KOVSKI et al., 2021).

Devido ao seu importante papel para o vírus, a proteína S é o principal alvo para a produção de anticorpos neutralizantes (MISTRY et al., 2022). A região genômica que codifica a proteína S é onde mais ocorrem mutações não sinônimas, que resultam em uma mudança de aminoácidos (CHOI et al., 2020). Essas mutações acontecem de forma natural, sendo frequentes em vírus de RNA genômico e podem gerar tanto consequências prejudiciais para os próprios vírus, sendo eliminados de circulação, ou podem gerar consequências benéficas originando variantes virais com vantagens no que se refere a replicação, transmissão e evasão imune (KARLSSON; KWIATKOWSKI; SABETI, 2014; MISTRY et al., 2022).

Fatores ambientais e os tratamentos farmacológicos utilizados podem agir como pressão seletiva para o aparecimento e continuidade dessas variantes, que ao manifestar virulência e transmissão distintas do original são consideradas como novas “cepas” (LAURING; HODCROFT, 2021; MASCOLA; GRAHAM; FAUCI, 2021; MISTRY et al., 2022).

As “variantes de preocupação” (VOC - em inglês, “*variants of concern*”) assim nomeadas pela OMS são definidas como variantes que representam um risco aumentado para a saúde pública global podendo estar associadas à diminuição da eficácia de vacinas, diagnósticos e terapêuticas disponíveis (WHO, 2022a). As principais VOCs do SARS-CoV-2 são a “Alpha” (B.1.1.7), identificada em setembro de 2020 no Reino Unido, a “Beta” (B.1.351) identificada em maio de 2020 na África do Sul, a “Gamma” (P.1) identificada em novembro de 2020 no Brasil, a “Delta” (B.1.617.2) identificada em outubro de 2020 na Índia, e mais recentemente a “Ômicron” (B.1.1.529) identificada em novembro de 2021 na África do Sul e, desde então, propagada em vários países sendo motivo de preocupação devido a possíveis efeitos de evasão da imunidade natural e induzida pelas vacinas (BURKI, 2021; MISTRY et al., 2022; ZHANG et al., 2021b).

A transmissão do vírus ocorre entre humanos por duas rotas: através do contato com partículas de vírus presentes em gotículas de fluido respiratório originados de possíveis tosse e espirros, e também, através do contato com superfícies contaminadas e de matéria fecal infectada (MURUGAN et al., 2021). O tempo de incubação do vírus é estimado de 4 a 14 dias até que se inicie os sintomas (PATRIKAR et al., 2020). Os sintomas da COVID-19 variam de acordo com o espectro clínico da infecção. Cerca de um terço dos infectados são assintomáticos, ou seja, testam positivo (por RT-PCR ou teste de antígeno) mas não apresentam sintomas característicos da COVID-19 (NIH, 2022; ORAN; TOPOL, 2021; SHOAIIB et al., 2021).

Dentre os infectados sintomáticos, a tosse, a falta de apetite, febre, dor de cabeça, mal estar, dor no corpo, náuseas, dor de garganta, corrimento nasal (rinorreia), diarreia, dor abdominal, perda do olfato são alguns dos sintomas mais comuns para quem desenvolve a forma leve da doença (MURUGAN et al., 2021). A forma moderada a grave ocorre em aproximadamente 15% dos infectados sintomáticos, geralmente com sintomas como respiração ofegante ou falta de ar (dispneia), podendo desenvolver pneumonia grave e síndrome respiratória aguda grave, cerca de 5% desenvolvem a forma crítica, são indivíduos que podem apresentar insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção múltipla de órgãos (CAO, 2020; NIH, 2022).

2.3 Gravidade da COVID-19 e Aspectos Imunológicos

Virtualmente, todos os indivíduos possuem risco de ter uma infecção por SARS-CoV-2 e desenvolver a COVID-19 grave, mas, ao longo da pandemia, foram identificados aspectos que colaboram para o agravamento da doença. Entre os fatores demográficos relacionados, sabe-se que existe uma clara associação entre pessoas com idade mais avançada (≥ 60 anos), do sexo masculino, pessoas que vivem em casas de repouso, que precisam de cuidados de longa duração e pessoas com condições médicas crônicas (NIH, 2022; PECKHAM et al., 2020; SHOAIB et al., 2021; ZHANG et al., 2021a).

As principais comorbidades associadas à gravidade e mortalidade na COVID-19 são: doença cardiovascular, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), câncer, hipertensão, doença renal, doença hepática, obesidade, doença falciforme e outras condições imunocomprometidas. Além disso, receptores de transplantes e grávidas também possuem maior risco de terem COVID-19 grave (NIH, 2022; SHARMA et al., 2021; SHOAIB et al., 2021; ZHANG et al., 2021a). Em estudos latino-americanos, a maior proporção de mortalidade foi observada em pacientes com doença renal crônica (81%) e doença hepática (65%), com resultados semelhantes na população europeia (THAKUR et al., 2021). Os pacientes críticos podem apresentar síndrome do desconforto respiratório agudo, choque séptico e trombose, esses pacientes necessitam de cuidados intensivos (UTI) e controle clínico apropriado (NIH, 2022). Monitorar diligentemente o curso da doença mostrou-se imprescindível para realizar o manejo clínico adequado ao paciente. Deste modo, alguns marcadores bioquímicos observados foram reconhecidos como determinantes de gravidade e mortalidade na COVID-19. Entre eles: níveis elevados de procalcitonina, contagem de células brancas, marcadores de danos no miocárdio, neutrófilos, creatinina no plasma, d-dímero, proteína C reativa, lactato desidrogenase (LDH), e também a diminuição na contagem de linfócitos, plaquetas, albumina,

entre outros. Muitos pacientes têm seus quadros clínicos agravados, podendo avançar para o óbito (IZCOVICH et al., 2020; SHARMA et al., 2021, 2021; SONG et al., 2020).

As respostas inflamatórias imunológicas estão intrinsecamente relacionadas ao desfecho da doença pois são imprescindíveis para eliminar a infecção viral, mas também possuem um papel no espectro clínico da COVID-19 (SONG et al., 2020). De forma imediata e inespecífica, a resposta imune inata é a primeira linha de detecção, defesa e controle contra os vírus. Ao entrar em contato com as vias aéreas do hospedeiro, os vírus encontram as células epiteliais mucosas que medeiam a interação entre o ambiente externo e o ambiente interno formando uma barreira físico-química que possui diversos mecanismos de defesa (LINDEN et al., 2008; MISTRY et al., 2022). Estas células, junto com os leucócitos, secretam o muco, um fluido viscoso que além de servir como obstáculo físico compõe-se por variadas moléculas de defesa como mucinas, defensinas, histatinas e protegrinas que são capazes de deter e eliminar patógenos invasores (LINDEN et al., 2008; MISTRY et al., 2022). Apesar disso, o SARS-CoV-2 é capaz de entrar nas células epiteliais através de seus receptores, mas uma resposta antiviral é iniciada assim que ele é detectado. O reconhecimento da invasão viral ocorre por meio dos receptores de reconhecimento de padrões ou RRP (do inglês *Pattern recognition receptors* ou PRRs) que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, do inglês, *Pathogen-associated molecular pattern*) presentes nas partículas virais ou gerados durante a sua replicação, e iniciam diversas cascatas de sinalização gerando uma forte resposta inflamatória (MISTRY et al., 2022; WANG et al., 2022; ZHANG; WANG; CHENG, 2022). Essa resposta envolve a ativação de fatores de transcrição em células imunes presentes no local da infecção, como os monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e IL-6, os interferons (IFN) e quimiocinas que recrutam células NK (natural killer), responsáveis por combater células infectadas com patógenos intracelulares (MISTRY et al., 2022; SCHULTZE; ASCHENBRENNER, 2021; ZHANG; WANG; CHENG, 2022).

O funcionamento adequado da resposta imune caracterizada por uma produção e liberação de células e citocinas antivirais no tempo e locais corretos são suficientes para o controle do SARS-CoV-2 (KING; SPRENT, 2021; MISTRY et al., 2022). Porém, o SARS-CoV-2 tem se mostrado eficiente em evadir a resposta imune inata utilizando-se de estratégias que variam de escape do reconhecimento pelos RRP, desligamento da expressão de genes do hospedeiro e clivagem de fatores essenciais para resposta mediada por IFN (ZHANG; WANG; CHENG, 2022). Há evidências de que exacerbação da infecção viral e da resposta imune estejam

relacionados à gravidade da COVID-19 (BLANCO-MELO et al., 2020; CAO, 2020; HARTENIAN et al., 2020; YANG et al., 2021; ZHANG; WANG; CHENG, 2022). Pacientes com COVID-19 moderada a grave exibem uma resposta imune desbalanceada, com pouca produção de IFN e elevada expressão de gene estimulado por IFN (ISG, do inglês, *interferon-stimulated gene*) (YANG et al., 2021). O IFN-I é responsável por limitar a proliferação e propagação do vírus e junto com os produtos dos ISGs potencializam a resposta imune inata e adaptativa para combater os vírus (KING; SPRENT, 2021), esse desequilíbrio encontrado resulta em uma falta de controle da replicação viral no início da infecção ao mesmo tempo que promove uma grande resposta inflamatória (BLANCO-MELO et al., 2020; YANG et al., 2021).

A resposta inflamatória exacerbada foi observada em indivíduos com COVID-19 grave (BLANCO-MELO et al., 2020; CAO, 2020; HADJADJ et al., 2020; RAMASAMY; SUBBIAN, 2021). Os pacientes exibiram um acúmulo de monócitos-macrófagos e neutrófilos nos pulmões que foi associada com uma elevada produção de citocinas e quimiocinas como IL-1b, TNF-a, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1/CCL2), IL-2, receptor solúvel de interleucina 2 (sIL-2RA), IL-6, IL-7, IL-17, IL-18, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), IP10 (CXCL10), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), proteína inflamatória de macrófago (MIP-1a/CCL3), MCP-3 (CCL7) e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 no plasma (HADJADJ et al., 2020; RAMASAMY; SUBBIAN, 2021). O recrutamento de células do perfil inflamatório realizado por estas moléculas induz a uma maior produção destas citocinas gerando o que se conhece por ‘tempestade de citocinas’ (HARTENIAN et al., 2020). A tempestade de citocinas pode ser definida como um conjunto de condições que tem como base a produção excessiva e autoperpetuada de citocinas conduzindo a uma manifestação clínica de hiperinflamação, hiperferritinemia e falência de múltiplos órgãos (OMBRELLO; SCHULERT, 2021). Na COVID-9 grave, a tempestade de citocinas possui papel principal na lesão do tecido pulmonar, na formação de tromboembolia e extravasamento vascular, ao estímulo de fibrose e consequente insuficiência respiratória aguda (RAMASAMY; SUBBIAN, 2021; V’KOVSKI et al., 2021).

Dentre os fatores predisponentes ao desenvolvimento da tempestade de citocinas, a capacidade do SARS-CoV-2 de afetar a transcrição das células infectadas para gerar perfis de expressão de citocinas pró-inflamatórias foi observada (HARTENIAN et al., 2020; V’KOVSKI et al., 2021). Foi demonstrado que a molécula viral ORF8 do SARS-CoV-2 pode ativar a via de sinalização do fator de transcrição NF-kB através de sua ligação com o receptor de IL-17 agravando a secreção de moléculas pró-inflamatórias (LIN et al., 2021; ZHANG; WANG;

CHENG, 2022). Appelberg e colaboradores (2020) mostraram que algumas vias de sinalização como a via do mTORC1 está hiperativa e associada ao estado crítico da doença, vários autores sugerem um papel importante desta via no contexto da COVID-19 e sua gravidade (BASILE et al., 2022; FATTAHI et al., 2022; KHEZRI; VARZANDEH; GHASEMNEJAD-BERENJI, 2022; LI et al., 2021; ZHENG; LI; LIU, 2020).

2.4 Evidências *mTOR* e SARS-CoV-2

A via de sinalização celular PI3K/AKT/mTOR pode estar envolvida em diversos aspectos da infecção e gravidade da COVID-19. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, em inglês, *Mechanistic Target of Rapamycin*) é uma serina treonina quinase da família PIKK (quinase relacionada com fosfatidilinositol 3-quinase) que foi descoberta através dos efeitos antiproliferativos e imunossupressores da rapamicina nas células de mamíferos (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). Possui funções cruciais para as células incluindo processos anabólicos, absorção de nutrientes, crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, motilidade, autofagia, entre várias outras funções (BASILE et al., 2022). A proteína mTOR faz parte de dois complexos funcionalmente distintos: o mTORC1 e mTORC2. Ambos possuem proteínas associadas em comum, porém o mTORC1 é composto por uma proteína regulatória associada a mTOR (Raptor) e o substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa (PRAS40), é sensível a rapamicina e regula aspectos temporais do crescimento celular. Enquanto o mTORC2 é composto por RICTOR (o companheiro insensível à rapamicina), as subunidades reguladoras proteína 1 de interação com MAPK (mSin1) e proteína associada a RICTOR 1 ou 2 (Protor 1/2), e atua nos aspectos espaciais do crescimento celular (BASILE et al., 2022; WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006). O mTOR integra diversas vias de sinalização que podem se iniciar através de fatores de crescimento, nutrientes, energia e estresse (WULLSCHLEGER; LOEWITH; HALL, 2006).

O papel do mTOR no desenvolvimento e regulação das respostas imunes está caracterizado em uma de suas vias de sinalização, a via PI3K/AKT/mTOR (Fosfatidilinositol-3-quinase/Serina-treonina quinase) (THOMSON; TURNQUIST; RAIMONDI, 2009). Essa via utiliza-se de mecanismos de fosforilação para transmissão da informação e começa com a ativação de PI3K através de fatores de crescimento, citocinas (IFN-1), moléculas co-estimulatórias e receptores de antígenos. Uma vez ativado, PI3K fosforila PIP2

questão. Alguns vírus como o Influenza A podem se beneficiar da inibição da via para promover a sua replicação, enquanto a ativação da via pode ser maléfica para a replicação de outros (como o vírus da hepatite C) (MAIESE, 2020). Estudos da inibição da via em infecções virais com o MERS-CoV e SARS-CoV-2 sugerem que estes vírus se utilizam da ativação desta via para a sua própria replicação e benefício (KINDRACHUK et al., 2015; MULLEN et al., 2021).

Análises de transcriptômica e proteômica mostraram uma hiperativação da via durante a infecção por SARS-CoV-2 que está associada ao estado crítico da doença (APPELBERG et al., 2020; BLAGOSKLONNY, 2020). De outra forma, foi sugerido que a proteína S do SARS-CoV-2 pode promover a inflamação e apoptose através do aumento de ROS e consequente inibição da via e estimulação de uma resposta autofágica (LI et al., 2021). O vírus pode modular a via em vários outros aspectos como no desenvolvimento de células B, na ativação de inflamassomas, na superprodução de citocinas pró-inflamatórias mediada pelo NF- κ B, sendo uma relação importante no desfecho da tempestade de citocinas (FARAHANI et al., 2022). Durante a infecção por SARS-CoV-2, as citocinas IL-6 e TNF interagem com seus receptores que estimulam um feedback positivo de ativação induzindo ao estímulo de diferentes vias de sinalização relacionadas a genes pró-inflamatórios. A IL-6 está relacionada com a diferenciação de monócitos e macrófagos que facilitam o recrutamento de neutrófilos no pulmão, atuando na promoção da hiper inflamação e consequente dano tecidual. A expressão elevada de TNF pode provocar extravasamento vascular, danos pulmonares e insuficiência cardíaca durante a COVID-19 (JIMÉNEZ; TORRES ARIAS, 2022). Várias pesquisas investigaram a associação de variações genéticas como SNVs (variantes de nucleotídeo único) com os fenótipos clínicos da COVID-19 até o momento (ADLI et al., 2022; YAMAMOTO et al., 2021; ZEPEDA-CERVANTES et al., 2022). Sabe-se que a desregulação da via mTOR está associada a diversas patologias como câncer, obesidade, diabetes, defeitos cognitivos e depressão (FARAHANI et al., 2022; FISH; PLATANIAS, 2014), e poderia estar sendo afetada pela presença de polimorfismos genéticos permitindo o aumento da patogenicidade do SARS-CoV-2.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

Há diferença entre a gravidade da COVID-19 e a produção de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos infectados por SARS-CoV-2 que possuem diferentes alelos no gene *MTOR*.

3.2 Objetivo Geral

Investigar a associação de variantes no gene *MTOR* na gravidade da COVID-19.

3.3 Objetivos Específicos

- Descrever a frequência de variantes no gene *MTOR* em uma população miscigenada;
- Avaliar a associação de variantes genéticas no gene *MTOR* com a gravidade, estado crítico e óbito da COVID-19;
- Avaliar o impacto de variantes genéticas no gene *MTOR* sobre a produção de citocinas TNF e IL-6 em pacientes infectados com SARS-CoV-2.

4 IMPACT OF *MTOR* GENE VARIANTS ON COVID-19 SEVERITY IN A BRAZILIAN POPULATION.”

ARTIGO: “Impact of *MTOR* gene variants on COVID-19 severity in a Brazilian population.”

Artigo a ser submetido a revista EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLI, A. et al. Role of genetic variants and host polymorphisms on COVID-19: From viral entrance mechanisms to immunological reactions. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 1846–1865, maio 2022.
- ALMEIDA, J. D.; TYRRELL, D. A. J. The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture. **Journal of General Virology**, v. 1, n. 2, p. 175–178, 1 abr. 1967.
- APPELBERG, S. et al. Dysregulation in Akt/mTOR/HIF-1 signaling identified by proteo-transcriptomics of SARS-CoV-2 infected cells. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1748–1760, 1 jan. 2020.
- BASILE, M. S. et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 3, p. 848–856, mar. 2022.
- BLAGOSKLONNY, M. V. From causes of aging to death from COVID-19. **Aging**, v. 12, n. 11, p. 10004–10021, 12 jun. 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.
- BOUTIN, S. et al. Host factors facilitating SARS-CoV-2 virus infection and replication in the lungs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 16, p. 5953–5976, 2021.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a Covid-19**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Brasília, Ed. 2, 2022. Disponível em: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_operacionalizacao_vacinacao_covid19.pdf>. Acesso em: 15 de outubro de 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância genômica do vírus SARS-CoV-2 no âmbito da SVS/MS**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Ed. 1, p. 52–52, 2021. Disponível em: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_genomica_SARS-CoV-2_ambito_SVS.pdf>. Acesso em: 05 de junho de 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Especial Doença pelo Novo Coronavírus - COVID-19 Semana Epidemiológica 52**. Brasília, Ed. 1, 2023. Disponível em: < [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-146-boletim-coecoronavirus/@@download/file/Boletim_COVID_146_6jan23_voc_v1b%20\(1\).pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-146-boletim-coecoronavirus/@@download/file/Boletim_COVID_146_6jan23_voc_v1b%20(1).pdf)>. Acesso em: 23 janeiro. 2023.
- BURKI, T. Understanding variants of SARS-CoV-2. **The Lancet**, v. 397, n. 10273, p. 462, 6 fev. 2021.
- CAO, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature Reviews**

Immunology, v. 20, n. 5, p. 269–270, maio 2020.

CAVALCANTE, J. R. et al. COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 4, ago. 2020.

CHOI, B. et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2291–2293, 3 dez. 2020.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, abr. 2020.

COSTA, R. D. S. et al. Effect of polymorphisms on TGFB1 on allergic asthma and helminth infection in an African admixed population. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 118, n. 4, p. 483- 488.e1, abr. 2017.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019.

DHAMA, K. et al. Coronavirus Disease 2019 –COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 48, 2020.

FARAHANI, M. et al. Molecular pathways involved in COVID-19 and potential pathway-based therapeutic targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112420, jan. 2022.

FATTAHI, S. et al. PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential target for anti-SARS-CoV-2 therapy. **Immunologic Research**, 2 fev. 2022.

FISH, E. N.; PLATANIAS, L. C. Interferon Receptor Signaling in Malignancy: A Network of Cellular Pathways Defining Biological Outcomes. **Molecular Cancer Research**, v. 12, n. 12, p. 1691–1703, 1 dez. 2014.

FUNG, T. S.; LIU, D. X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. **Annual Review of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 529–557, 8 set. 2019.

GE, X.-Y. et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. **Nature**, v. 503, n. 7477, p. 535–538, nov. 2013.

HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718–724, 7 ago. 2020.

HAMMING, I. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, jun. 2004.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, set. 2020.

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, abr. 2020.

HU, B. et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006698, 30 nov. 2017.

IZCOVICH, A. et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0241955, 17 nov. 2020.

JIMÉNEZ, D.; TORRES ARIAS, M. Immunouniverse of SARS-CoV-2. **Immunological Medicine**, v. 45, n. 4, p. 186–224, 2 out. 2022.

KARLSSON, E. K.; KWIATKOWSKI, D. P.; SABETI, P. C. Natural selection and infectious disease in human populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 6, p. 379–393, jun. 2014.

KATHRYN V. HOLMES. CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE). **CORONAVIRUSES (CORONAVIRIDAE)**, v. Encyclopedia of Virology, p. 291–298, 1999.

KAYODE, A. J. et al. An Overview of the Pathogenesis, Transmission, Diagnosis, and Management of Endemic Human Coronaviruses: A Reflection on the Past and Present Episodes and Possible Future Outbreaks. **Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1108, 30 ago. 2021.

KHEZRI, M. R.; VARZANDEH, R.; GHASEMNEJAD-BERENJI, M. The probable role and therapeutic potential of the PI3K/AKT signaling pathway in SARS-CoV-2 induced coagulopathy. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 27, n. 1, p. 6, dez. 2022.

KINDRACHUK, J. et al. Antiviral Potential of ERK/MAPK and PI3K/AKT/mTOR Signaling Modulation for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection as Identified by Temporal Kinome Analysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1088–1099, fev. 2015.

KING, C.; SPRENT, J. Dual Nature of Type I Interferons in SARS-CoV-2-Induced Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 4, p. 312–322, 1 abr. 2021.

LAURING, A. S.; HODCROFT, E. B. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? **JAMA**, v. 325, n. 6, p. 529–531, 9 fev. 2021.

LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 237–261, 29 set. 2016.

LI, F. et al. SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, p. 166260, dez. 2021.

LI, X. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 102–108, abr. 2020.

- LIN, X. et al. ORF8 contributes to cytokine storm during SARS-CoV-2 infection by activating IL-17 pathway. **iScience**, v. 24, n. 4, p. 102293, 23 abr. 2021.
- LINDEN, S. K. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 3, p. 183–197, maio 2008.
- MAIESE, K. The Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR): Novel Considerations as an Antiviral Treatment. **Current Neurovascular Research**, v. 17, n. 3, p. 332–337, 29 set. 2020.
- MASCOLA, J. R.; GRAHAM, B. S.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 Viral Variants—Tackling a Moving Target. **JAMA**, v. 325, n. 13, p. 1261–1262, 6 abr. 2021.
- MEYERHOLZ, D. K.; PERLMAN, S. Does common cold coronavirus infection protect against severe SARS-CoV-2 disease? **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 1, p. e144807, 4 jan. 2021.
- MILLET, J. K.; WHITTAKER, G. R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. **Virus Research**, v. 202, p. 120–134, abr. 2015.
- MISTRY, P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 809244, 3 jan. 2022.
- MULLEN, P. J. et al. SARS-CoV-2 infection rewires host cell metabolism and is potentially susceptible to mTORC1 inhibition. **Nature Communications**, v. 12, p. 1876, 25 mar. 2021.
- MURUGAN, C. et al. COVID-19: A review of newly formed viral clades, pathophysiology, therapeutic strategies and current vaccination tasks. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1165–1200, dez. 2021.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. p. 401, maio 2022.
- OMBRELLO, M. J.; SCHULERT, G. S. COVID-19 and cytokine storm syndrome: are there lessons from macrophage activation syndrome? **Translational Research**, v. 232, p. 1–12, jun. 2021.
- ORAN, D. P.; TOPOL, E. J. The Proportion of SARS-CoV-2 Infections That Are Asymptomatic: A Systematic Review. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 5, p. 655–662, maio 2021.
- OVSYANNIKOVA, I. G. et al. The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. **Immunological Reviews**, v. 296, n. 1, p. 205–219, jul. 2020.
- PATRIKAR, S. R. et al. Incubation Period and Reproduction Number for Novel Coronavirus 2019 (COVID-19) Infections in India. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 32, n. 8, p. 458–460, nov. 2020.

- PECKHAM, H. et al. Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ICU admission. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 6317, dez. 2020.
- PYRC, K.; BERKHOUT, B.; VAN DER HOEK, L. The Novel Human Coronaviruses NL63 and HKU1. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3051–3057, abr. 2007.
- RAMASAMY, S.; SUBBIAN, S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. e00299-20, 16 jun. 2021.
- SAXENA, S. et al. Clinical characteristic and epidemiological features of SARS CoV-2 disease patients from a COVID-19 designated hospital in New Delhi. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 4, p. 2487–2492, abr. 2021.
- SCHULTZE, J. L.; ASCHENBRENNER, A. C. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1671–1692, 1 abr. 2021.
- SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021.
- SHARMA, J. et al. Clinical Predictors of COVID-19 Severity and Mortality: A Perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 674277, 25 out. 2021.
- SHOAIB, N. et al. COVID-19 severity: Studying the clinical and demographic risk factors for adverse outcomes. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0255999, 11 ago. 2021.
- SIU, Y. L. et al. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 82, n. 22, p. 11318–11330, 15 nov. 2008.
- SONG, J.-W. et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3410, dez. 2020.
- THAKUR, B. et al. A systematic review and meta-analysis of geographic differences in comorbidities and associated severity and mortality among individuals with COVID-19. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8562, dez. 2021.
- THOMSON, A. W.; TURNQUIST, H. R.; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nature Reviews. Immunology**, v. 9, n. 5, p. 324–337, maio 2009.
- V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021.
- WANG, Y. et al. The effects of SARS-CoV-2 infection on modulating innate immunity and strategies of combating inflammatory response for COVID-19 therapy. **Journal of Biomedical Science**, v. 29, p. 27, 3 maio 2022.
- WEICHHART, T.; HENGSTSCHLÄGER, M.; LINKE, M. Regulation of innate immune cell

function by mTOR. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 599–614, out. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>>. Acesso em: 5 jun. 2022a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV)**. 30 jan. 2022b. Disponível em: <[https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihr-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ihr-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov))>. Acesso em: 22 maio. 2022.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 10 fev. 2006.

YAMAMOTO, N. et al. Does Genetic Predisposition Contribute to the Exacerbation of COVID-19 Symptoms in Individuals with Comorbidities and Explain the Huge Mortality Disparity between the East and the West? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 5000, 8 maio 2021.

YANG, Y. et al. Gastrointestinal Microenvironment and the Gut-Lung Axis in the Immune Responses of Severe COVID-19. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 647508, 12 abr. 2021.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, jun. 2020.

ZEPEDA-CERVANTES, J. et al. Implications of the Immune Polymorphisms of the Host and the Genetic Variability of SARS-CoV-2 in the Development of COVID-19. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 94, 6 jan. 2022.

ZHANG, N. et al. The Severity of COVID-19 and Its Determinants: A Systematic Review and Meta-Analysis in China. **Sustainability**, v. 13, n. 9, p. 5305, 10 maio 2021a.

ZHANG, S.; WANG, L.; CHENG, G. The battle between host and SARS-CoV-2: Innate immunity and viral evasion strategies. **Molecular Therapy**, v. 30, n. 5, p. 1869–1884, 4 maio 2022.

ZHANG, Y. et al. Immune Evasive Effects of SARS-CoV-2 Variants to COVID-19 Emergency Used Vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 771242, 22 nov. 2021b.

ZHENG, Y.; LI, R.; LIU, S. Immunoregulation with mTOR inhibitors to prevent COVID-19 severity: A novel intervention strategy beyond vaccines and specific antiviral medicines. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1495–1500, set. 2020.