

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/12/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Thayná Ruiz Ferreira

**Identificação de marcadores de resistência
e suscetibilidade em casais discordantes
na infecção por SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

**Botucatu
2022**

Thayná Ruiz Ferreira

Identificação de marcadores de resistência
e suscetibilidade em casais discordantes
na infecção por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ferreira, Thayná Ruiz.

Identificação de marcadores de resistência e suscetibilidade em casais discordantes na infecção por SARS-CoV-2 / Thayná Ruiz Ferreira. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luciane Alarcão Dias-Melicio
Capes: 21102007

1 COVID-19 (Doença). 2. Equipamento de proteção individual. 3. Receptores de citocinas. 4. Citocinas. 5. Máscaras. 6. SARS-CoV-2.

Palavras-chave: ACE2; Casais discordantes; NETs; SARS-CoV-2; TLRs.

DEDICATÓRIA

À minha família: mãe, pai e irmã, exemplos de determinação – sem vocês eu nada seria. *In memoriam* de Creusa Maria dos Santos, nossa querida “dona Silvia”, minha avó, que nos deixou na pandemia e que foi e sempre será o coração da família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais Adinaldo e Rosângela, e irmã Thamyres, pela compreensão durante essa trajetória ao serem privados em muitos momentos de minha companhia e atenção. Obrigada por todo o amparo e conforto fornecido para que eu pudesse me preocupar com minha formação, além de todo o amor e carinho.

Agradeço à minha orientadora, Luciane Alarcão Dias-Melicio, pela oportunidade de me inserir no Laboratório de Imunopatologia e Agentes Infecciosos – LIAI e todo o acolhimento e confiança passados para que conseguíssemos, criar e expandir o conhecimento acerca dessa doença.

Agradeço a todos os colaboradores que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização dessa pesquisa. Em especial, à assistente Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira pela disponibilidade, companhia e ensinamentos; ao professor José Luiz Proença Módena e sua aluna Camila Lopes Simeoni, pela colaboração e provimento da variante utilizada; e também à professora Márjorie de Assis Golim e Aline Márcia Marques Braz, pelo auxílio na execução das metodologias e colaboração.

Agradeço ao Escritório de Apoio à Pesquisa - EAP e principalmente à secretária Cinthia Scolastico Cecilio de Souza e pesquisador José Eduardo Corrente, pela disponibilidade e serviços oferecidos para realização do planejamento e análises estatísticas do projeto.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, Ana Laura Ortega Dezen e Fernando Couso Correia, que acompanharam todos os momentos vividos da pós-graduação compartilhando as preocupações e formando um laço de amizade que desejo levar adiante. Também à Larissa de Carvalho pelo acolhimento inicial e colaboração.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço ainda os auxílios concedidos através dos processos nº

2018/09706-7 (com aplicação emergencial na linha de COVID-19) e 2021/13354-1, ambos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Às minhas companheiras de voleibol, treinador e colegas das casas onde morei, espero ter somado e criado boas memórias em suas vidas. E por fim, aos meus melhores amigos que fiz durante a graduação, especialmente à Gabrieli Camossa Armagni, Giovana do Nascimento Pereira e Marcus Vinicius Cordeiro Costa, obrigada por serem também um pilar de suporte para que eu não desistisse.

RESUMO

O sistema imunológico é essencial para controlar e eliminar patógenos como o SARS-CoV-2, agente da COVID-19 que vem sendo transmitida desde dezembro de 2019. Fatores como o uso adequado de máscaras e outras medidas de proteção individual, status socioeconômico, e acesso aos serviços de saúde são algumas variáveis que podem explicar a variação de incidência e mortalidade da doença entre os indivíduos expostos. A determinação de possíveis diferenças de resposta entre indivíduos expostos à mesma cepa viral em casais discordantes para a infecção pode representar um caminho importante para um melhor entendimento das respostas dos infectados. Assim, focando a resposta de neutrófilos de casais que tiveram diagnóstico positivo e negativo para COVID-19, objetivamos identificar e avaliar após diferentes estímulos: a expressão de receptores ACE2, TLR4 e TLR9; a produção de diferentes citocinas em sobrenadante; e a liberação de NETs, em busca de possíveis marcadores de resistência e suscetibilidade. Um recrutamento foi realizado através de formulário online com inclusão de casais com diagnóstico discordante confirmado por teste molecular, e que tenham se infectado antes do recebimento das doses da vacinação. A coleta de sangue venoso periférico foi realizada para o isolamento de neutrófilos e agonistas de TLRs (LPS e ODN CpG) e SARS-CoV-2 inativado foram utilizados para desafio destas células. A detecção das expressões de ACE2, TLR4 e TLR9 foi realizada utilizando diferentes anticorpos conjugados a fluorocromos por citometria de fluxo. A liberação de NETs séricas e em sobrenadante de cultura foi quantificada com auxílio do kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay e anticorpo anti-elastase. O kit LEGENDplex™ Human Essential Immune Response Panel (13-plex) foi utilizado para quantificação de citocinas em sobrenadante. A análise estatística foi realizada considerando nível de significância de 5%, de acordo com a distribuição dos dados e com auxílio do SAS Analytics Software e GraphPad Prism 6. Após os estímulos encontramos algumas diferenças de respostas entre os casais. Foram detectadas variações de neutrófilos ACE2+. Quando as células dos indivíduos COVID-19 negativo foram estimuladas com ODN CpG, a porcentagem aumentou e foi superior aos indivíduos positivos. Além disso, esse grupo apresentou as maiores porcentagens de neutrófilos TLR4+ sem estímulo e após SARS-CoV-2 inativado. Apesar disso, neutrófilos do grupo COVID-19 positivo apresentaram níveis de TLR4 mais elevados. Para a expressão de TLR9, esse comportamento é invertido quando estimulado com SARS-CoV-2 inativado. Em relação à liberação de NETs, neutrófilos do COVID-19 positivo produziram mais NETs (mesmo sem a infecção aguda), principalmente em níveis séricos e sem estímulo. Após estímulos, COVID-19 negativo apresentou os níveis mais altos comparativamente e também são capazes de produzir mais IL-8. Assim, há uma indicação de diferença de resposta entre neutrófilos pertencentes a diferentes grupos que podem representar alguns fatores de resistência e suscetibilidade à infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; casais discordantes; NETs; ACE2; TLRs; citocinas.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	8
Introdução.....	9
Aspectos gerais da COVID-19	10
Características dos coronavírus e o SARS-CoV-2.....	11
A infecção e resposta imune dos neutrófilos.....	12
Fatores associados à resistência e suscetibilidade dos indivíduos...	13
Justificativa e objetivos.....	15
Referências.....	16
CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
1. Introduction.....	22
2. Material and methods.....	23
2.1 <i>Recruitment of volunteers and blood collection</i>	23
2.2 <i>Neutrophil isolation</i>	24
2.3 <i>Neutrophil stimulation with inactivated virus and TLR agonists</i>	24
2.4 <i>Receptors expression by Flow Cytometry</i>	25
2.5 <i>Quantifying NETs</i>	25
2.6 <i>Supernatant cytokine quantification</i>	26
2.7 <i>Statistical analysis</i>	26
3. Results.....	26
3.1 <i>Characteristics of discordant couples</i>	26
3.2 <i>ACE2 and TLRs expression in neutrophils</i>	27
3.3 <i>Production and release of NETs</i>	32
3.4 <i>Cytokines produced by neutrophils</i>	32
4. Discussion.....	33
5. Conclusions.....	37
References.....	38

Referências

1. Meskini M, Rezghi Rami M, Maroofi P, Ghosh S, Siadat SD, Sheikhpour M. An Overview on the Epidemiology and Immunology of COVID-19. *Journal of Infection and Public Health*. 1 de outubro de 2021;14(10):1284–98.
2. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). PubMed. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
3. Ministério da Saúde. Coronavírus Brasil [Internet]. 2022. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>
4. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The Journal of Gene Medicine*. 1 de fevereiro de 2021;23(2):e3303.
5. Rana R, Tripathi A, Kumar N, Ganguly NK. A Comprehensive Overview on COVID-19: Future Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 14 de setembro de 2021;11:744903.
6. Bastos LS, Ranzani OT, Souza TML, Hamacher S, Bozza FA. COVID-19 hospital admissions: Brazil's first and second waves compared. *The Lancet Respiratory Medicine*. 1 de agosto de 2021;9(8):e82–3.
7. Liu M, Shi L, Chen H, Wang X, Yang M, Jiao J, et al. Comparison Between China and Brazil in the Two Waves of COVID-19 Prevention and Control. *Journal of Epidemiology and Global Health*. 30 de março de 2022;12(2):168–81.
8. World Health Organization (WHO). COVID-19 Dashboard [Internet]. 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int>
9. Pan American Health Organization (PAHO), World Health Organization (WHO). Weekly COVID-19 Epidemiological Update – 01 November 2022 [Internet]. 1 de novembro de 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/paho-weekly-covid-19-epidemiological-update-1-november-2022>
10. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Current Medical Science*. 9 de julho de 2021;41(6):1037–51.
11. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 24 de janeiro de 2020;395(10223):497–506.
12. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*. 1 de janeiro de 2020;9(1):221–36.
13. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, 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*. 25 de Janeiro de 2012;86(7):3995–4008.

14. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *Journal of Medical Virology*. 17 de maio de 2020;92(10):2105–13.

15. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*. Janeiro de 2017;25(1):35–48.

16. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*. Junho de 2016;24(6):490–502.

17. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. 17 de março de 2020;26(4):450–2.

18. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. Março de 2020;181(2):271–80.e8.

19. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cell. *Europe PMC*. 2020.

20. Lima RS, Rocha LPC, Moreira PR. Genetic and epigenetic control of *ACE2* expression and its possible role in COVID-19. *Cell Biochemistry and Function*. 1 de junho de 2021;39(6):713–26.

21. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Critical Care*. 13 de julho de 2020;24(1):422.

22. Arnold RH. COVID-19 – Does This Disease Kill Due to Imbalance of the Renin Angiotensin System (RAS) Caused by Genetic and Gender Differences in the Response to Viral ACE 2 Attack? *Heart, Lung and Circulation*. Julho de 2020;29(7):964–72.

23. Gemmati D, Bramanti B, Serino ML, Secchiero P, Zauli G, Tisato V. COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-Chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males? *International Journal of Molecular Sciences*. 14 de maio de 2020;21(10):3474.

24. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbanjo IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*. Abril de 2020;181(5):1016-1035.e19.

25. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*. 24 de fevereiro de 2020;12(1):1–5.

26. Mohammadpour S, Torshizi Esfahani A, Halaji M, Lak M, Ranjbar R. An updated review of the association of host genetic factors with susceptibility and resistance to COVID-19. *Journal of Cellular Physiology*. 15 de junho de 2020;236(1):49–54.
27. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, Veen W, Brügggen M, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. Julho de 2020;75(7):1564–81.
28. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of Leukocyte Biology*. 13 de junho de 2020;108(1):17–41.
29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 5 de março de 2004;303(5663):1532–5.
30. Ackermann M, Anders H-J, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, De Lorenzo R, et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death and Differentiation*. 1 de novembro de 2021;28(11):3125–39.
31. Janiuk K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells*. 14 de janeiro de 2021;10(1):151.
32. Mozzini C, Girelli D. The role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an hypothesis or a potential new field of research? *Thrombosis Research*. Julho de 2020;191:26–7.
33. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *The Journal of Experimental Medicine*. 14 de setembro de 2020;217(12):e20201129.
34. Tomar B, Anders H-J, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells*. 2 de junho de 2020;9(6):E1383.
35. Szturmowicz M, Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 de Agosto de 2021;22(16):8854.
36. Castelli EC, de Castro MV, Naslavsky MS, Scliar MO, Silva NSB, Andrade HS, et al. MHC Variants Associated With Symptomatic Versus Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Highly Exposed Individuals. *Frontiers in Immunology*. 28 de setembro de 2021;12:742881.
37. Fakhroo AD, Al Thani AA, Yassine HM. Markers Associated with COVID-19 Susceptibility, Resistance, and Severity. *Viruses*. 30 de dezembro de 2020;13(1):E45.
38. Vahidy FS, Pan AP, Ahnstedt H, Munshi Y, Choi HA, Tiruneh Y, et al. Sex differences in susceptibility, severity, and outcomes of coronavirus disease 2019: Cross-sectional analysis from a diverse US metropolitan area. Lazzeri C, editor. *PLOS ONE*. 13 de janeiro de 2021;16(1):e0245556.

39. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*. 1 de outubro de 2016;16(10):626–38.
40. Galasso V, Pons V, Profeta P, Becher M, Brouard S, Foucault M. Gender differences in COVID-19 attitudes and behavior: Panel evidence from eight countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 3 de novembro de 2020;117(44):27285–91.
41. Suen LKP, So ZYY, Yeung SKW, Lo KYK, Lam SC. Epidemiological investigation on hand hygiene knowledge and behaviour: a cross-sectional study on gender disparity. *BMC Public Health*. 11 de abril de 2019;19(1):401.
42. Silva MVR, de Castro MV, Passos-Bueno MR, Otto PA, Naslavsky MS, Zatz M. Men are the main COVID-19 transmitters: behavior or biology? *Discover Mental Health*. 2022;2(1):1.
43. Bi Q, Lessler J, Eckerle I, Lauer SA, Kaiser L, Vuilleumier N, et al. Insights into household transmission of SARS-CoV-2 from a population-based serological survey. *Nature Communications*. 15 de junho de 2021;12(1):3643.
44. Hall J, Harris R, Zaidi A, Woodhall S, Dabrera G, Dunbar J. HOSTED—England’s Household Transmission Evaluation Dataset: preliminary findings from a novel passive surveillance system of COVID-19. *International Journal of Epidemiology*. 9 de abril de 2021;50(3):743–52.

References

1. Meskini M, Rezghi Rami M, Maroofi P, Ghosh S, Siadat SD, Sheikhpour M. An Overview on the Epidemiology and Immunology of COVID-19. *Journal of Infection and Public Health*. 2021 Oct 1;14(10):1284–98.
2. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). *PubMed*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
3. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmailzadeh A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The Journal of Gene Medicine*. 2021 Feb 1;23(2).
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Mar;181(2):271–80.
5. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, Veen W, Brügger M, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1564–81.
6. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020 Jun 13;108(1):17–41.
7. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5663):1532–5.
8. Ackermann M, Anders H-J, Bilyy R, Bowlin GL, Daniel C, De Lorenzo R, et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death and Differentiation*. 2021 Nov 1;28(11):3125–39.
9. Janiuk K, Jabłońska E, Garley M. Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells*. 2021 Jan 14;10(1):151.
10. Mozzini C, Girelli D. The role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an hypothesis or a potential new field of research? *Thrombosis Research*. 2020 Jul;191:26–7.
11. Tomar B, Anders H-J, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells*. 2020 Jun 2;9(6):1383.
12. Szturmowicz M, Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Aug 17;22(16):8854.
13. Kaiser R, Leunig A, Pekayvaz K, Popp O, Joppich M, Polewka V, et al. Self-

sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. *JCI Insight*. 2021 Sep 22;6(18):e150862.

14. Castelli EC, de Castro MV, Naslavsky MS, Scliar MO, Silva NSB, Andrade HS, et al. MHC Variants Associated With Symptomatic Versus Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Highly Exposed Individuals. *Frontiers in Immunology*. 2021 Sep 28;12:742881.

15. Fakhroo AD, Al Thani AA, Yassine HM. Markers Associated with COVID-19 Susceptibility, Resistance, and Severity. *Viruses*. 2020 Dec 30;13(1):E45.

16. Gemmati D, Bramanti B, Serino ML, Secchiero P, Zauli G, Tisato V. COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-Chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males? *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 May 14;21(10):3474.

17. Anastassopoulou C, Gkizarioti Z, Patrinos GP, Tsakris A. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. *Human Genomics*. 2020 Oct 22;14(1):40.

18. Fricke-Galindo I, Falfán-Valencia R. Genetics Insight for COVID-19 Susceptibility and Severity: A Review. *Frontiers in Immunology*. 2021 Apr 1;12:622176.

19. Galasso V, Pons V, Profeta P, Becher M, Brouard S, Foucault M. Gender differences in COVID-19 attitudes and behavior: Panel evidence from eight countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 Nov 3;117(44):27285–91.

20. Hou Y, Zhao J, Martin W, Kallianpur A, Chung MK, Jehi L, et al. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. *BMC Medicine*. 2020 Jul 15;18(1):216.

21. Scarinci IC, Pandya VN, Kim Y-I, Bae S, Peral S, Tipre M, et al. Factors Associated with Perceived Susceptibility to COVID-19 Among Urban and Rural Adults in Alabama. *J Community Health*. 2021;46(5):932–41.

22. Vahidy FS, Pan AP, Ahnstedt H, Munshi Y, Choi HA, Tiruneh Y, et al. Sex differences in susceptibility, severity, and outcomes of coronavirus disease 2019: Cross-sectional analysis from a diverse US metropolitan area. Lazzeri C, editor. *PLOS ONE*. 2021 Jan 13;16(1):e0245556.

23. Velavan TP, Pallerla SR, Rüter J, Augustin Y, Kremsner PG, Krishna S, et al. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *EBioMedicine*. 2021 Oct;72:103629.

24. Silva MVR, de Castro MV, Passos-Bueno MR, Otto PA, Naslavsky MS, Zatz M. Men are the main COVID-19 transmitters: behavior or biology? *Discover Mental Health*. 2022;2(1):1.

25. Bi Q, Lessler J, Eckerle I, Lauer SA, Kaiser L, Vuilleumier N, et al. Insights into household transmission of SARS-CoV-2 from a population-based serological survey. *Nature Communications*. 2021 Jun 15;12(1):3643.

26. Hall JA, Harris RJ, Zaidi A, Woodhall SC, Dabrera G, Dunbar JK. HOSTED-England's Household Transmission Evaluation Dataset: preliminary findings from a novel passive surveillance system of COVID-19. *Int J Epidemiol*. 2021;50(3):743–52.
27. Suen LKP, So ZYY, Yeung SKW, Lo KYK, Lam SC. Epidemiological investigation on hand hygiene knowledge and behaviour: a cross-sectional study on gender disparity. *BMC Public Health*. 2019 Apr 11;19(1):401.
28. Lima RS, Rocha LPC, Moreira PR. Genetic and epigenetic control of *ACE2* expression and its possible role in COVID-19. *Cell Biochemistry and Function*. 2021 Jun 1;39(6):713–26.
29. Radzikowska U, Ding M, Tan G, Zhakparov D, Peng Y, Wawrzyniak P, et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26 and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy*. 2020 Jun 4;75(11):2829–45.
30. Li G, He X, Zhang L, Ran Q, Wang J, Xiong A, et al. Assessing ACE2 expression patterns in lung tissues in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Autoimmunity*. 2020 Apr;112:102463.
31. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *The Journal of Experimental Medicine*. 2020 Sep 14;217(12):e20201129.
32. Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2021 Feb 9;93(5):2735–9.
33. Aboudounya MM, Heads RJ. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. Dozio E, editor. *Mediators of Inflammation*. 2021 Jan 14;2021:1–18.
34. Taniguchi-Ponciano K, Vadillo E, Mayani H, Gonzalez-Bonilla CR, Torres J, Majluf A, et al. Increased expression of hypoxia-induced factor 1 α mRNA and its related genes in myeloid blood cells from critically ill COVID-19 patients. *Annals of Medicine*. 2020 Dec 21;53(1):197–207.
35. Vakil MK, Mansoori Y, Al-Awsi GRL, Hosseinipour A, Ahsant S, Ahmadi S, et al. Individual genetic variability mainly of Proinflammatory cytokines, cytokine receptors, and toll-like receptors dictates pathophysiology of COVID-19 disease. *Journal of Medical Virology*. 2022 May 31;94(9):4088–96.
36. Bezemer GFG, Garssen J. TLR9 and COVID-19: A Multidisciplinary Theory of a Multifaceted Therapeutic Target. *Frontiers in Pharmacology*. 2021 Jan 15;11:601685.
37. Dömer D, Walther T, Möller S, Behnen M, Laskay T. Neutrophil Extracellular Traps Activate Proinflammatory Functions of Human Neutrophils. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jun 8;12:636954.
38. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Apr 24;5(11):138999.

39. Masso-Silva JA, Moshensky A, Lam MTY, Odish MF, Patel A, Xu L, et al. Increased Peripheral Blood Neutrophil Activation Phenotypes and Neutrophil Extracellular Trap Formation in Critically Ill Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Case Series and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*. 2022 Feb 1;74(3):479–89.
40. Del Valle DM, Kim-schulze S, Hsin-hui H, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature helps predict COVID-19 severity and death. *pesquisabvsaludorg*. 2020;26:1636–43.
41. Guéant J, Guéant-Rodriguez R, Fromonot J, Oussalah A, Louis H, Chery C, et al. Elastase and exacerbation of neutrophil innate immunity are involved in multi-visceral manifestations of COVID-19. *Allergy*. 2021 Feb 27;76(6):1846–58.
42. Teijeira A, Garasa S, Ochoa M del C, Cirella A, Olivera I, Glez-Vaz J, et al. Differential Interleukin-8 thresholds for chemotaxis and netosis in human neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2021 Jun 4;51(9):2274–80.
43. Melero I, Villalba-Esparza M, Recalde-Zamacona B, Jiménez-Sánchez D, Teijeira Á, Argueta A, et al. Neutrophil Extracellular Traps, Local IL-8 Expression, and Cytotoxic T-Lymphocyte Response in the Lungs of Patients With Fatal COVID-19. *Chest*. 2022 Nov 1;162(5):1006–16.
44. Ma A, Zhang L, Ye X, Chen J, Yu J, Zhuang L, et al. High Levels of Circulating IL-8 and Soluble IL-2R Are Associated With Prolonged Illness in Patients With Severe COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jan 29;12:626235.