



Articolo

La N-acetilcisteina riduce l'attivazione dell'inflammasoma indotta dalle proteine del SARS-CoV-2 in vitro

Javier Milara^{1,2,3,*}, Fernando Martínez-Expósito⁴, Paula Montero^{1,5}, Inés Roger^{1,3,5}, Maria Amparo Bayarri¹, Pilar Ribera¹, Miriam Natsuki Oishi-Konari⁴, Jose Ramón Alba-García⁴, Enrique Zapater^{4,†} e Julio Cortijo^{1,3,6,†}

¹ Dipartimento di Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università di Valencia, 46014 Valencia, Spagna

² Unità di Farmacia, Ospedale Generale Universitario Consortile, 46014 Valencia, Spagna

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Istituto di Sanità Carlos III, 46014 Valencia, Spagna

⁴ Dipartimento di otorinolaringoiatria, Consorci Hospital General Universitari de Valencia, 46014 Valencia, Spagna

⁵ Facoltà di Scienze della Salute, Universidad Europea de Valencia, 46010 Valencia, Spagna

⁶ Unità di Ricerca e Insegnamento, Ospedale Generale Universitario Consortile, 46014 Valencia, Spagna

* Corrispondenza: xmlara@hotmail.com

† Questi autori hanno contribuito in egual misura a questo lavoro.

Abstract: L'attivazione degli inflammasomi è uno dei primi passi nell'avvio delle risposte immunitarie innate. In questo lavoro abbiamo studiato l'attivazione degli inflammasomi nelle vie aeree di pazienti COVID-19 gravemente malati e gli effetti della N-acetilcisteina (NAC) sugli inflammasomi. Le biopsie tracheali sono state ottenute da pazienti critici senza COVID-19 e senza malattie respiratorie (controllo, $n = 32$), SARS-CoV-2 variante B.1 ($n = 31$) e B.1.1.7 variante VOC alfa ($n = 20$). L'espressione genica e proteica è stata misurata mediante RT-qPCR e immunostochimica. I macrofagi e le cellule epiteliali bronchiali sono stati stimolati con diverse proteine ricombinanti SARS-CoV-2 S, E, M e N in presenza o in assenza di NAC. Il complesso dell'inflammasoma NLRP3 è stato sovraespresso e attivato nella variante COVID-19 B.1.1.7 VOC e associato all'infiammazione sistemica e alla mortalità a 28 giorni. Anche il rapporto TLR2/MyD88 e il redox NOX4/Nrf2 erano sovraespressi nella variante COVID-19 B.1.1.7 VOC. La combinazione di proteine ricombinanti S-E-M SARS-CoV-2 ha aumentato il rilascio di citochine nei macrofagi e nelle cellule epiteliali bronchiali attraverso l'attivazione del TLR2. La NAC ha inibito il rilascio di citochine e l'attivazione dell'inflammasoma indotti dal SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M). In sintesi, l'inflammasoma è iperattivato nella COVID-19 grave e aumentato nella variante B.1.1.7 VOC. Inoltre, la NAC è in grado di ridurre l'attivazione dell'inflammasoma indotta dal SARS-CoV-2 in vitro, il che potrebbe avere un potenziale valore traslazionale nei pazienti affetti da COVID-19.

Parole chiave: inflammasoma; COVID-19; SARS-CoV-2; N-acetilcisteina



Citazione: Milara, J.;

Martínez-Expósito, F.; Montero, P.; Roger, I.; Bayarri, M.A.; Ribera, P.; Oishi-Konari, M.N.; Alba-García, J.R.; Zapater, E.; Cortijo, J.

La N-acetilcisteina riduce l'attivazione dell'inflammasoma indotta dalle proteine del SARS-CoV-2 in vitro. *Int.*

J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 14518. <https://doi.org/10.3390/ijms232314518>

Editore accademico: Paolo Cameli

Ricevuto: 25 ottobre 2022

Accettato: 19 novembre 2022

Pubblicato: 22 novembre 2022

Nota dell'editore: MDPI rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e alle affiliazioni istituzionali.



Copyright: © 2022 dagli autori.

Licenziatario MDPI, Basilea,

Svizzera. Questo articolo è un

articolo ad accesso libero distribuito

secondo i termini e le condizioni della

licenza Creative Commons

Attribuzione (CC BY) ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Introduzione

La pandemia COVID-19, causata dal coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 (SARS-CoV-2), ha causato la morte di oltre 6,3 milioni di persone in tutto il mondo e rimane incontrollata. Il virus infetta principalmente le vie respiratorie, causando febbre, tosse secca, anosmia e dispnea, come sintomi comuni, ma ben il 10-15% dei pazienti può sviluppare una polmonite grave, che può progredire fino all'ipossia e alla sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), richiedendo la ventilazione meccanica con una prognosi infausta [1,2].

La COVID-19 grave è comunemente trattata con cure di supporto e solo pochi trattamenti sono stati approvati con una limitata riduzione della mortalità [3-8]. I vaccini contro la SARS-CoV-2 sono la principale strategia preventiva per controllare la pandemia, ma la somministrazione di vaccini in tutto il mondo è limitata. Inoltre, la comparsa di nuove varianti virali immuno-evasive e la probabilità di raggiungere l'immunità immediata giustificano la necessità di ulteriori trattamenti per mitigare la progressione della malattia.

La risposta iperinflammatoria inappropriata è riconosciuta come la causa di molti casi gravi di COVID-19, guidata da un rilascio esagerato di citochine infiammatorie [9]. Sin dall'inizio della pandemia, è stato proposto che l'iperattivazione dell'inflammasoma potesse partecipare alla risposta iperinflammatoria del SARS-CoV-2. È ormai riconosciuto un ruolo dell'iperinflammatione guidata dall'inflammasoma nella fisiopatologia della COVID-19 nei pazienti, ma solo da pochi mesi è stato dimostrato che l'attivazione dell'inflammasoma nei macrofagi infetti può guidare la patologia della COVID-19 in modelli animali [10-12]. In genere, gli inflammasomi sono complessi citosolici multiproteici in cui i sensori canonici, come NLRP3, si oligomerizzano e reclutano l'adattatore apoptosis-associated speck- protein containing a CARD (ASC) per formare specchi inflammasomici, all'interno dei quali viene reclutata e attivata la caspasi 1 infiammatoria. Dopo l'attivazione, la caspasi 1 trasforma la pro-IL-1 β e la pro-IL-18 nelle loro forme funzionali di citochine, che avviano la produzione di diverse altre citochine come IL-6, IL-8 e TNF α , tutte sovraesprese nella COVID-19 grave [13,14]. L'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 può essere innescata da un ampio numero di pattern molecolari associati a patogeni (PAMP) o a danni (DAMP), come l'efflusso di K^+ citosolico, l'afflusso di Ca^{2+} citosolico, il rilascio di ossigeno reattivo e la produzione di citochine specie (ROS) o ATP da cellule danneggiate [15].

Il SARS-CoV-2 può mediare la stimolazione dell'immunità innata e l'infiammazione attraverso l'attivazione del recettore toll-like (TLR) 2, promuovendo l'attivazione di MyD88 e dei fattori nucleari (NF)- κ B, delle protein chinasi attivate dal mitogeno (MAPK) e dei fattori regolatori dell'interferone (IFN) (IRF), che possono innescare l'espressione di diverse citochine pro-infiammatorie, dei sensori dell'immunità innata, come NLRP3, e la produzione di IFN [16].

Recenti scoperte indicano il ruolo potenziale dell'idrogeno solforato (H₂S) come fattore fondamentale di difesa dell'ospite contro l'infezione da SARS-CoV-2 [17], dimostrando che bassi livelli sierici di H₂S sono inversamente correlati a biomarcatori infiammatori come IL-6 e proteina C-reattiva (CRP), e sono anche associati a una prognosi sfavorevole nei pazienti con COVID-19 grave [18]. Inoltre, la riduzione del glutatione (GSH) può essere alla base delle gravi manifestazioni e della morte per COVID-19 [19]. La N-acetilcisteina (NAC) può aumentare la produzione endogena di H₂S e reintegrare i pool intracellulari di GSH ridotto. Inoltre, la NAC ha dimostrato la capacità di ripristinare lo squilibrio redox intracellulare e di ridurre diverse vie infiammatorie mediate da Nf- κ B, suggerendo proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antivirali [20-22]. Ad oggi, i dati disponibili sull'efficacia della terapia con NAC nella COVID-19 sono scarsi e controversi [23-27].

In questo lavoro, abbiamo caratterizzato l'attivazione dell'inflammasoma nelle vie respiratorie di pazienti critici con e senza COVID-19. Inoltre, abbiamo esplorato l'effetto della NAC sull'attivazione dell'inflammasoma e sull'infiammazione indotta dal SARS-CoV-2 in vitro. I risultati forniti in questo lavoro hanno mostrato che (1) le proteine dell'inflammasoma sono particolarmente sovraesprese nei pazienti critici con COVID-19, (2) il SARS-CoV-2 aumenta le proteine dell'inflammasoma e l'infiammazione attraverso l'attivazione del TLR2, (3) la NAC è in grado di inibire l'attivazione dell'inflammasoma nelle cellule stimulate con le proteine del SARS-CoV-2 attraverso l'inibizione di Nf- κ B e NLRP3. I risultati forniti in questo lavoro possono essere potenzialmente utili per comprendere gli effetti della NAC nei pazienti affetti da COVID-19.

2. Risultati

2.1. I componenti dell'inflammasoma sono sovraespressi nel tessuto delle vie aeree di pazienti con malattia critica COVID-19

Sono stati ottenuti segmenti di tessuto tracheale per studiare l'attivazione dell'inflammasoma nelle vie aeree di pazienti COVID-19 malati critici della prima ondata spagnola (variante B.1; $n = 31$ pazienti) e della terza ondata (variante B.1.1.7 VOC alfa; $n = 20$) e confrontati con pazienti non infetti malati critici ($n = 32$). Le caratteristiche cliniche sono descritte nella Tabella 1.

Tabella 1. Dati clinici di base dei pazienti. I dati sono stati acquisiti al momento della biopsia tracheale. I dati sono *n* (%) o mediani, range interquartile (IQR), salvo diversa indicazione. Mortalità a 28 giorni: decesso entro 28 giorni dal ricovero; ALT: alanina aminotransferasi; BMI: indice di massa corporea; BPCO: broncopneumopatia cronica ostruttiva; CRP: proteina C reattiva; LDH: lattato deidrogenasi; PAFiO2 = frazione di PaO2/FiO2; * *p* < 0,05 rispetto alla coorte di controllo; # *p* < 0,05 rispetto alla variante B.1.

Variabile	Coorte di controllo	Covid-19 (B.1)	Covid-19 (B.1.1.7 VOC)
Numero di pazienti	32	31	20
Età (anni) [IQR]	65.2 [58.5-74]	67.7 [60.5-75.5]	80 [69.7-91.7] *,#
Maschi (%)	26 (81.2)	18 (58.1)	9 (45)
Esito, <i>n</i> (sì %)	19 (59.4)	17 (54.8)	20 (100) *,#
Mortalità a 28 giorni, <i>n</i> (sì %)	13 (40.6)	4 (12.9)*	19 (95) *,#
Fumatore (sì %)	17 (53.1)	11 (35.5)	8 (40)
Diabete (sì %)	6 (18.7)	6 (19.3)	7 (35)
BPCO (sì %)	5 (15.6)	0 (0)	2 (10)
Ipertensione arteriosa (sì %)	15 (46.8)	14 (45.1)	17 (85) *,#
Dislipemia (sì %)	11 (34.4)	11 (35.4)	11 (55)
IMC (kg/m2) [IQR]	26.8 [21.4-40.9]	32 [28.8-33.3]	30.2 [25.7-33.7]
Linfociti (10 * 9/L) [IQR]	0.95 [0.5-1.3]	1.05 [0.5-1.27]	0.67 [0.3-0.8]
Neutrofili (10 * 9/L) [IQR]	9.4 [6.3-12.8]	8.7 [5.9-11.2]	14.2 [6.5-20.5]
CRP (mg/L) [IQR]	8.4 [0.8-15.4]	5.8 [0.3-9.2]	14.05 [6.7-19.8] *,#
LDH (U/L) [IQR]	702 [630-774]	584.3 [496-666]	951 [692-1111] **,#
D-dimero (ng/mL) [IQR]	332 [263-425]	1593 [536-1929]	2797 [251-1473]
Procalcitonina (ng/mL) [IQR]	3.49 [0.3-1.9]	0.43 [0.07-1.25] *	7.45 [0.08-7.6]
pO2 (mmHg) [IQR]	148.1 [98.1-188.5]	138.1 [80.5-174.8]	92.2 [53-115] *,#
pCO2 (mmHg) [IQR]	42.9 [37-52]	48.9 [42.2-52.7]	45.6 [41-52]
PaFiO2 [IQR]	279.8 [214-366]	240.1 [193-258]	220.2 [166-274]
HCO3 (mmol/L) [IQR]	24.8 [20.4-27.9]	31.6 [27.8-33.6] *	27.9 [24.8-31.3]
Ferritina (µg/L) [IQR]	855 [240-1305]	930.9 [399-1443]	1045 [389-1448]
ALT (U/L) [IQR]	41.8 [10.7-60]	73.3 [32-104]	61.8 [23-70]
Corticosteroidi sistemici, <i>n</i> (%)	17 (53.1)	25 (80.6) *	18 (90) *

L'espressione dell'mRNA dei prodotti dell'attivazione dell'inflammasoma, come l'IL-1 β e l'IL-18, è risultata sovraespressa nei pazienti COVID-19/B.1 (Figura 1; *p* < 0,0001 rispetto ai pazienti di controllo) e sovraespressa nei pazienti COVID-19/B.1.1.7 (Figura 1; *p* < 0,0001 rispetto ai pazienti COVID-19/B.1). Di conseguenza, anche l'espressione dei componenti dell'inflammasoma, come NLRP3, ASC e caspasi 1, è risultata sovraespressa nei pazienti COVID-19/B.1.1.1 e nella variante COVID-19/B.1.1.7 (Figura 1; *p* < 0,01 rispetto ai pazienti COVID-19/B.1.1), suggerendo un'attivazione più robusta dell'inflammasoma nelle vie respiratorie dei pazienti con la variante COVID-19/B.1.1.7.

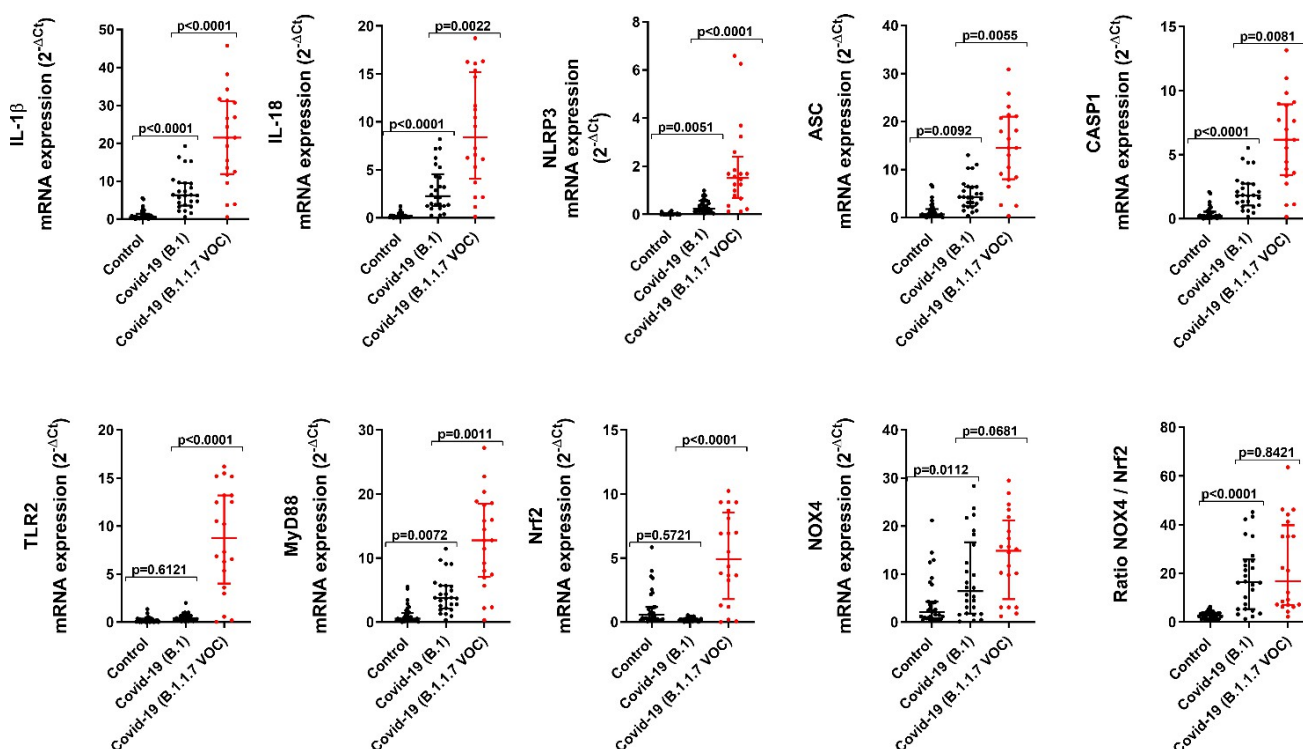


Figura 1. Espressione genica dell'inflammasoma, dell'immunità innata e degli elementi redox nelle biopsie tracheali di malati critici COVID-19. Le biopsie tracheali sono state ottenute da pazienti critici ventilati in modo invasivo senza COVID-19 e senza malattie/infezioni respiratorie (controllo, $n = 32$), SARS-CoV-2 variante B.1 ($n = 31$) e B.1.1.7 variante VOC alfa ($n = 20$). L'mRNA totale è stato estratto e quantificato mediante RT-qPCR per analizzare l'espressione dei geni dell'inflammasoma IL-1 β , IL-18, NLRP3, ASC, CASP1, dei geni dell'immunità innata TLR2, MyD88 e dei geni redox Nrf2 e NOX4. I dati sono presentati come scatter dot blot con valori mediani e range interquartile. I valori di p sono basati sul test di Kruskal-Wallis e sul test post hoc di Dunn per i confronti multipli.

Inoltre, l'espressione dell'NLRP3 mRNA tracheale in entrambe le varianti COVID-19 correlava con la proteina C reattiva (CRP) e la lattato deidrogenasi (LDH) nel siero e con l'età dei pazienti (Tabella 2).

Tabella 2. Correlazioni tra NLRP3-inflammasoma e parametri analitici. ALT: alanina aminotransferasi; CRP: proteina C reattiva; LDH: lattato deidrogenasi. * $p < 0,05$.

Espressione dell'mRNA di NLRP3 rispetto a quella di un'altra persona.	Spearman ρ	p Valore
Età (anni)	0.4065	0.0092 *
Leucociti ($10^9/L$)	0.2122	0.194
Linfociti ($10^9/L$)	-0.1716	0.2962
Neutrofili ($10^9/L$)	0.2370	0.1464
Monociti ($10^9/L$)	0.04033	0.8074
CRP (mg/dL)	0.5374	0.0003 *
LDH (U/L)	0.5193	0.0016 *
Ferritina ($\mu g/L$)	0.3262	0.0597
ALT (U/L)	-0.04604	0.7867

Risultati precedenti indicano che il SARS-CoV-2 può attivare la via immunitaria innata TLR2 [16]. In questo lavoro, abbiamo osservato una sovraespressione di TLR2 e del suo adattatore MyD88 accoppiato nel tessuto tracheale dei pazienti COVID-19/B.1.1.7 (Figura 1; $p < 0,0001$ rispetto ai pazienti COVID-19/B.1), mentre solo MyD88 era sovraespresso nella variante COVID-19/B.1 (Figura 1; $p = 0,0077$ rispetto ai pazienti di controllo).

L'iperinfiammazione delle vie aeree è accompagnata da un aumento dello stress ossidativo. In questo lavoro, abbiamo analizzato l'equilibrio tra il fattore di trascrizione antiossidante nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) e la nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) ossidasi NOX4. Nrf2 non è stato influenzato nella variante COVID-19/B.1, ma è aumentato nella variante COVID-19/B.1.1.7 (Figura 1; $p < 0,0001$ rispetto ai pazienti COVID-19/B.1), mentre NOX4 è stato upregolato in entrambe le varianti COVID-19. Il rapporto tra l'espressione di NOX4 e Nrf2 è aumentato in entrambe le varianti COVID-19, il che indica che gli effetti protettivi di Nrf2 sono superati dagli effetti ossidativi di NOX4 (Figura 1).

L'analisi immunohistochemica ha mostrato risultati simili a quelli osservati nella valutazione dell'espressione genica (Figura 2A). L'espressione dei componenti dell'inflammasoma (IL-1 β clivato, CASP1 clivato, ASC e NLRP3) è risultata aumentata nelle varianti COVID-19 e sovraespressa nei pazienti COVID-19/B.1.1.7 (Figura 2; $p < 0,05$ rispetto alla variante COVID-19/B.1), come indica il punteggio composto immunohistochemico (Figura 2B). L'espressione dei componenti dell'inflammasoma era localizzata principalmente nelle cellule infiammatorie infiltrate nel tessuto connettivo tracheale e, in misura minore, nell'epitelio pseudostratificato (Figura 2A). Come osservato nei risultati dell'espressione genica, anche l'espressione di TLR2/MyD88 e NOX4/Nrf2 era sovraespressa nei pazienti COVID-19 (Figura 2B).

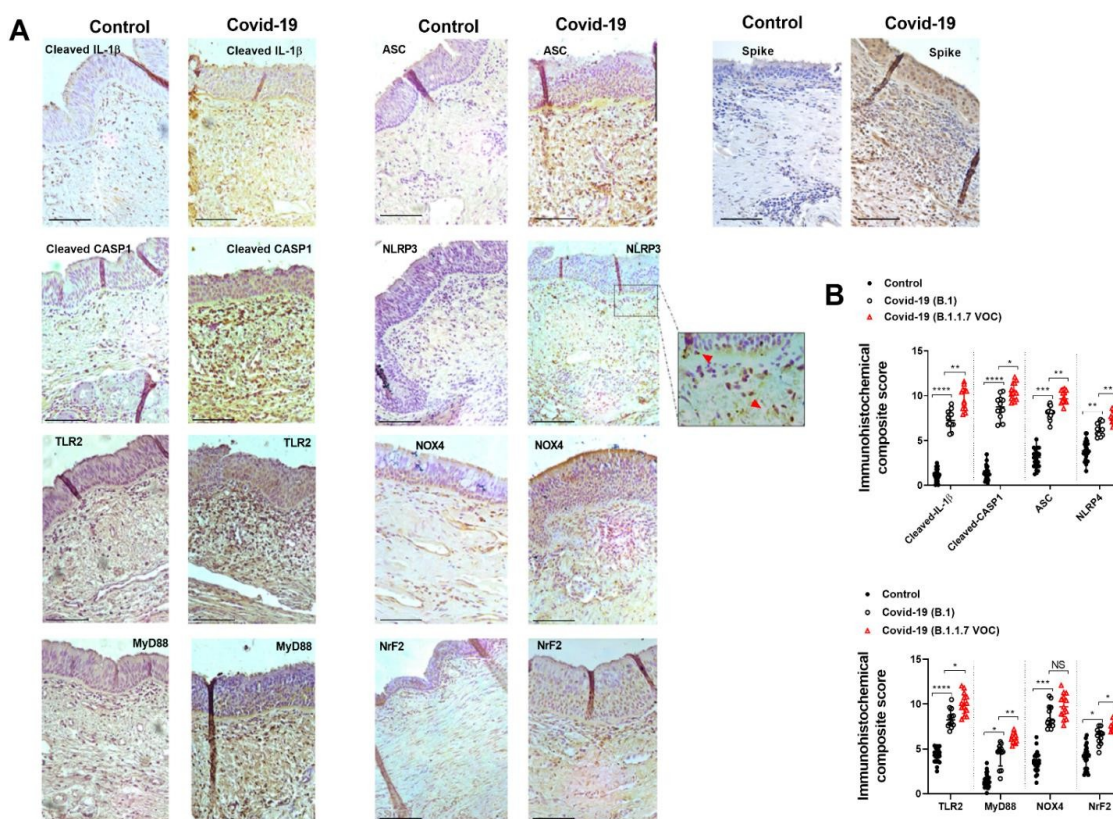


Figura 2. Analisi immunohistochemica dell'inflammasoma, dell'immunità innata e degli elementi redox nelle biopsie tracheali di COVID-19 in pazienti critici. Le biopsie tracheali sono state ottenute da pazienti critici ventilati in modo invasivo senza COVID-19 e senza malattie/infezioni respiratorie (controllo, $n = 32$), SARS-CoV-2 variante B.1 ($n = 31$) e B.1.1.7 variante VOC alfa ($n = 20$). (A) Le biopsie tracheali sono state immunocolorate con gli anticorpi indicati. Sono mostrate immagini rappresentative di diversi pazienti. (B) Quantificazione del punteggio composto immunohistochemico. Le frecce rosse indicano la formazione di strutture punteggiate di NLRP3. Barra di scala: 100 μm . I dati sono presentati come scatter dot blot con valori mediani e range interquartile. I valori di p sono basati sul test di Kruskal-Wallis e sul test post hoc di Dunn per confronti multipli. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

L'attivazione dell'inflammasoma richiede l'oligomerizzazione di NLRP3, che recluta la proteina ASC per formare i puntini dell'inflammasoma che possono essere visualizzati come strutture punteggiate nei saggi di immunofluorescenza. In questo caso, abbiamo osservato una maggiore formazione di strutture punteggiate NLRP3/ASC nei pazienti COVID-19/B.1 (Figura 3A; $p < 0,0001$ rispetto ai pazienti di controllo) e sovraesprese nei pazienti COVID-19/B.1.1.7 (Figura 3A; $p < 0,0001$ rispetto ai pazienti COVID-19/B.1). In base all'aumentata attivazione dell'inflammasoma, abbiamo osservato che l'espressione dell'mRNA di NLRP3 era significativamente sovraespressa nel tessuto tracheale dei pazienti COVID-19 deceduti a causa della COVID-19 e nei pazienti deceduti entro 28 giorni dal ricovero (Figura 3B,C).

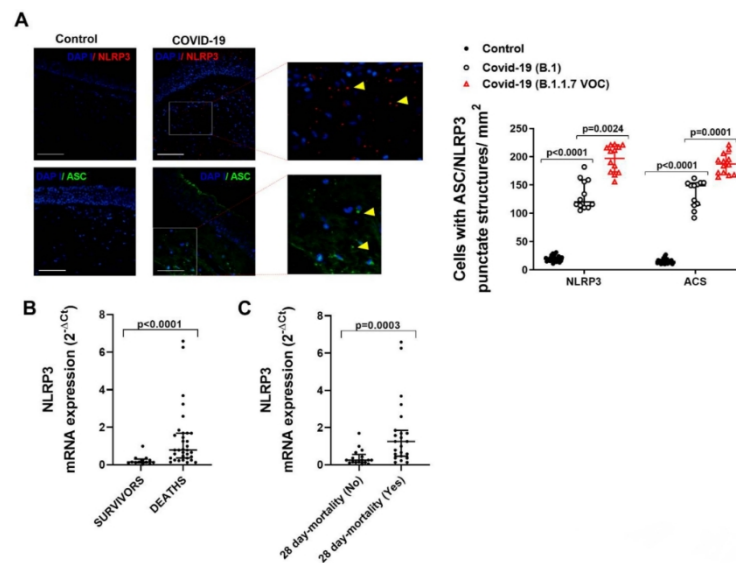


Figura 3. La formazione e l'espressione delle strutture punteggiate dell'inflammasoma NLRP3/ASC è aumentata nei pazienti con COVID-19 e associata alla gravità. Le biopsie tracheali sono state ottenute da pazienti malati critici venosi invasivi senza COVID-19 e senza malattie/infezioni respiratorie (controllo, $n = 32$), SARS-CoV-2 variante B.1 ($n = 31$) e B.1.1.7 variante VOC alfa ($n = 20$). (A) Immunofluorescenza di NLRP3 e ASC nelle biopsie tracheali. Le frecce gialle indicano la formazione di strutture punteggiate dell'inflammasoma. Barra di scala: 100 μm . (B) Espressione mRNA di NLRP3 nei pazienti COVID-19 sopravvissuti e deceduti in condizioni critiche. (C) Mortalità a 28 giorni: decesso entro 28 giorni dal ricovero. I dati sono presentati come scatter dot blot con valori mediani e range interquartile. I valori di p sono basati sul test di Kruskal-Wallis e sul test post hoc di Dunn per i confronti multipli.

2.2. La combinazione delle proteine S, E e M del SARS-CoV-2 favorisce il rilascio di proteine infiammatorie nei macrofagi umani e nelle cellule epiteliali bronchiali

Le proteine ricombinanti del SARS-CoV-2, come le glicoproteine N, M, E, S1 e S2, la combinazione delle proteine S, E e M e la proteina ricombinante del mosaico S-E-M a una concentrazione di 50nM sono state utilizzate come stimolo per 24 ore in macrofagi U934 e HBEC differenziati. Le singole proteine ricombinanti non sono state in grado di indurre il rilascio di IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α o IL-8 in entrambi i tipi di cellule (Figura 4A,B). Tuttavia, la combinazione delle proteine S, E e M o la proteina ricombinante immunogena del mosaico S-E-M a 50ng/mL sono state in grado di indurre il rilascio di IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α e IL-8 in entrambi i tipi di cellule (Figura 4A,B). Pertanto, per il resto degli esperimenti abbiamo utilizzato la proteina ricombinante a mosaico (S-E-M).

Rapporti precedenti indicano che l'induzione di proteine pro-infiammatorie da parte del SARS-CoV-2 è mediata dalla proteina TLR2 nei macrofagi umani [28]. In questo lavoro, il silenziamento del gene TLR2 mediante siRNA-TLR2 transitorio ha soppresso gli effetti della proteina ricombinante del mosaico (S-E-M) sul rilascio di citochine infiammatorie sia nei macrofagi umani differenziati U937 (Figura 5A) sia nelle cellule epiteliali bronchiali BEAS2B (Figura 5B), suggerendo che l'attivazione immunitaria innata della proteina ricombinante del mosaico (S-E-M) è mediata dal segnale TLR2.

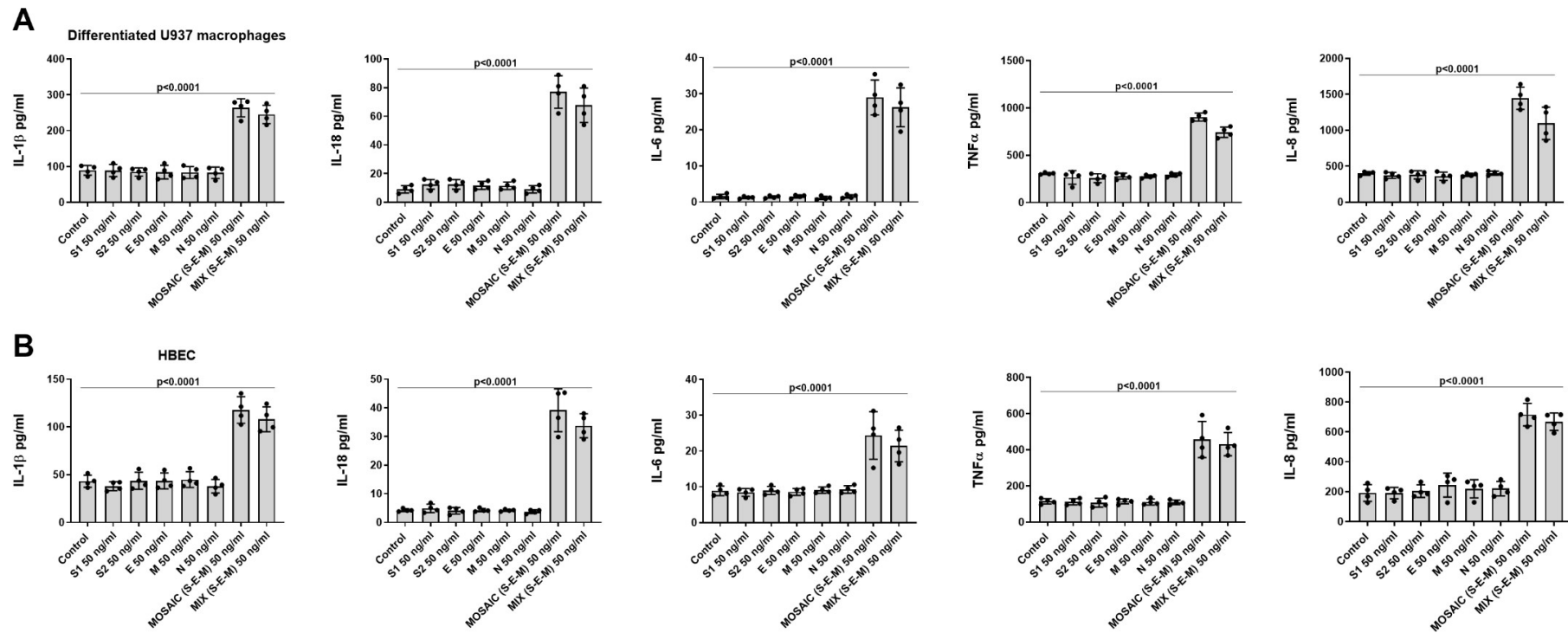


Figura 4. La combinazione di proteine ricombinanti SARS-CoV-2 S, E e M ha indotto il rilascio di citochine infiammatorie in macrofagi U937 differenziati umani e cellule epiteliali bronchiali. **(A)** Macrofagi U937 differenziati e **(B)** cellule epiteliali bronchiali umane (HBEC) di due soggetti sono stati stimolati con proteine ricombinanti del SARS-CoV-2 a 50 ng/mL, con la combinazione di proteine ricombinanti S1 + E + M a 50 ng/mL ciascuna o con la proteina ricombinante a mosaico (S-E-M) per 24 h. I surnatanti delle cellule sono stati raccolti e le citochine sono state misurate mediante ELISA. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti eseguiti in triplo, con valori medi e range interquartile. I valori di p sono basati sul test di Kruskal-Wallis e sul test post-hoc di Dunn per il confronto multiplo.

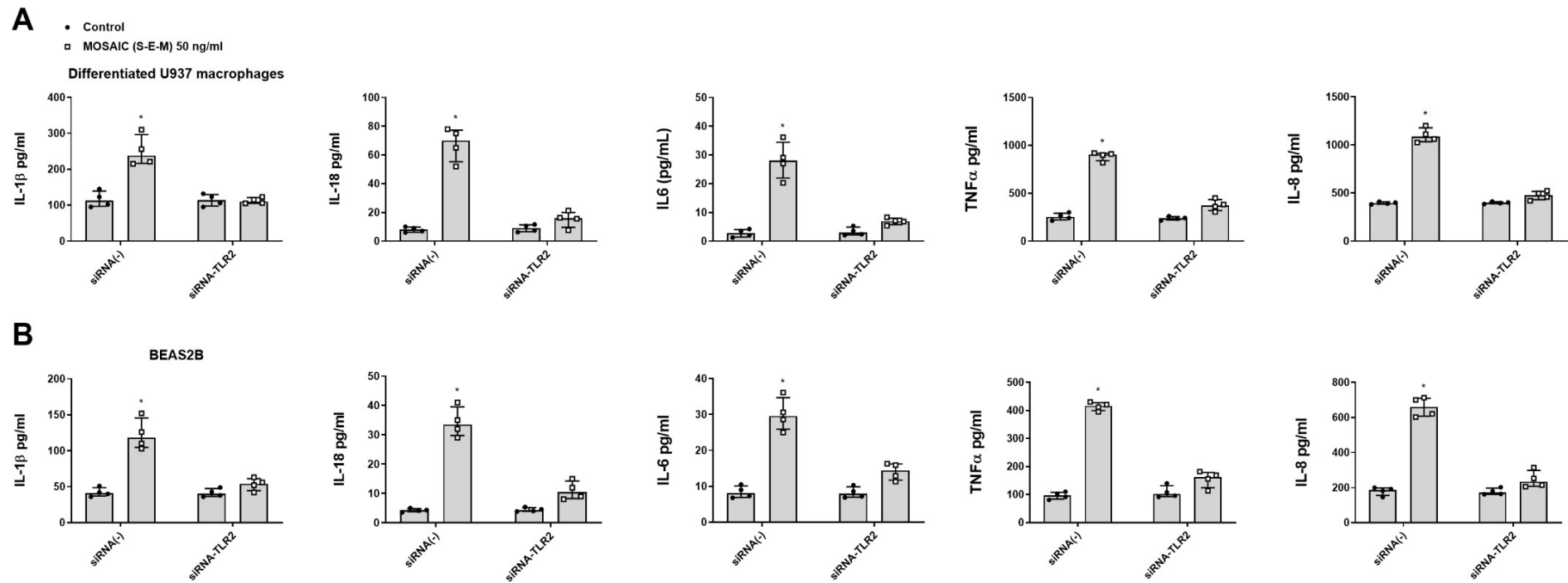


Figura 5. La proteina ricombinante del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) media le risposte infiammatorie attraverso il recettore toll-like 2 (TLR2). (A) Macrofagi U937 differenziati e (B) cellule epiteliali bronchiali BEAS2B sono state trasfettate transitoriamente con siRNA(-) di controllo o siRNA-TLR2 e stimolate con veicolo (controllo) o con la proteina mosaico (S-E-M) per 24 ore. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo.

In esperimenti simili, la proteina ricombinante del mosaico (S-E-M) ha aumentato l'espressione dell'mRNA dei componenti dell'inflammasoma NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β e IL-18, nonché di Nrf2 e NOX4, che sono stati soppressi dalla trasfezione transitoria di siRNA-TLR2 nei macrofagi U937 differenziati (Figura 6) e nelle cellule epiteliali bronchiali BEAS2B (Figura 7).

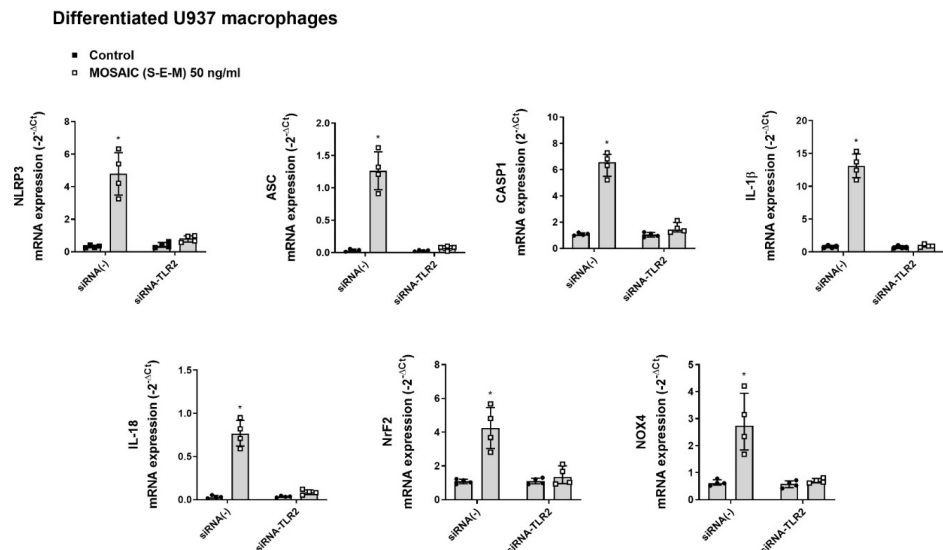


Figura 6. La proteina ricombinante del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) media l'espressione dell'inflammasoma e del redox attraverso il recettore toll-like 2 (TLR2) nei macrofagi U937 differenziati. I macrofagi U937 differenziati sono stati trasfettati transitoriamente con siRNA(-) di controllo o siRNA-TLR2 e stimolati con veicolo (controllo) o mosaico (S-E-M) per 24 ore. L'espressione dell'mRNA dei geni target è stata misurata mediante RT-qPCR. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti condotti in triplicato, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo.

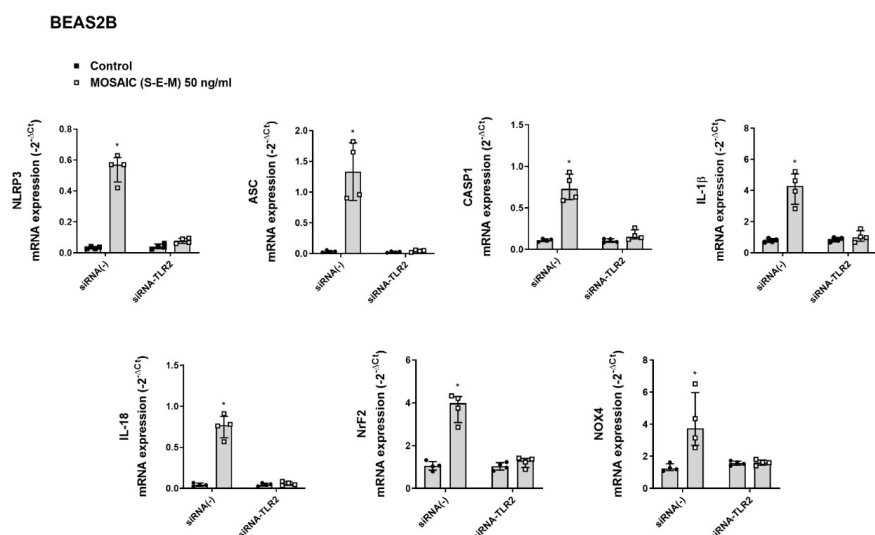


Figura 7. La proteina ricombinante del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) media l'espressione dell'inflammasoma e della redox attraverso il recettore toll-like 2 (TLR2) nelle cellule epiteliali bronchiali BEAS2B. Le cellule BEAS2B sono state trasfettate transitoriamente con siRNA(-) di controllo o siRNA-TLR2 e stimolate con veicolo (controllo) o mosaico (S-E-M) per 24 ore. L'espressione dell'mRNA dei geni target è stata misurata mediante RT-qPCR. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti condotti in triplicato, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo.

2.3. La N-acetilcisteina inibisce l'infiammazione da SARS-CoV-2 Mosaico (S-E-M) in modo dipendente dalla concentrazione e dal tempo in macrofagi e cellule epiteliali bronchiali

Sono state aggiunte concentrazioni di N-acetilcisteina (NAC) di 16 μM , 35 μM , 1,6 mM e 5 mM per 24 h, 72 h e 144 h, seguite dalla stimolazione con la proteina ricombinante del mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) per altre 24 h. Dopo 24 h e 72 h di pre-incubazione con NAC, solo le concentrazioni di NAC di 1,6 mM e 5 mM hanno mostrato un robusto effetto inibitorio su IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , IL-8 e TNF- α indotte dal mosaico (S-E-M). 1,6 mM e 5 mM di NAC hanno mostrato un robusto effetto inibitorio sulla secrezione di IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α e IL-8 indotta dal mosaico (S-E-M) nei macrofagi U937 differenziati (Figura 8A) e nelle cellule BEAS2B (Figura 8B). Inoltre, la NAC a concentrazioni di 16 μM e 35 μM ha mostrato effetti inibitori sulle citochine pro-infiammatorie indotte dal mosaico (S-E-M) dopo 144 ore di pre-incubazione, suggerendo che basse concentrazioni di NAC in un periodo di tempo prolungato hanno proprietà anti-infiammatorie (Figura 8A,B).

Analogamente, l'incubazione di NAC per 144 ore a tutte le concentrazioni testate 16 μM , 35 μM , 1,6 mM e 5 mM hanno inibito l'effetto del mosaico (S-E-M) sull'espressione degli mRNA degli inflammasomi NLRP3, ASC, CASP1, IL-1 β e IL-18 e sull'espressione degli mRNA di Nrf2 e NOX4 nei macrofagi U937 differenziati (Figura 9) e nelle cellule epiteliali BEAS2B (Figura 10).

2.4. La N-acetilcisteina inibisce l'attivazione dell'inflammasoma indotta dal SARS-CoV-2 Mosaico (S-E-M) e le vie infiammatorie intracellulari $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ e ERK1/2

Per studiare gli effetti della NAC sull'attivazione dell'inflammasoma indotto dal mosaico (S-E-M), i macrofagi U937 differenziati sono stati incubati con NAC 16 μM per 144 h, seguiti dalla stimolazione con la proteina ricombinante del mosaico (S-E-M) SARS-CoV-2 in presenza di NAC per 24 h. Al termine della stimolazione, è stato aggiunto ATP 5 mM per 1 h per stimolare l'assemblaggio e l'attivazione di NLRP3. In queste condizioni, la NAC è stata in grado di ridurre la formazione della forma attiva breve di CASP1 p20 (Figura 11A), nonché la conseguente forma attiva dell'IL-1 β clivata (Figura 11B), che si è tradotta in una riduzione della formazione di strutture punteggiate NLRP3/ASC (Figura 11C) e in una ridotta secrezione di IL-1 β (Figura 11D).

In altri esperimenti, le cellule U937 differenziate sono state pre-incubate con NAC 16 μM per 144 h o con l'inibitore del TLR2 oxPAPC a 30 $\mu\text{g/mL}$ per 1 h, seguite dalla stimolazione con la proteina SARS-CoV-2 a mosaico (S-E-M) per 30 e 60 minuti. Sia la NAC che l'oxPAPC hanno ridotto le fosforilazioni di I κ B e Nf κ B indotte dal mosaico (S-E-M) a 60 minuti di stimolazione e la fosforilazione di ERK1/2 dopo 30 minuti di stimolazione (Figura 12).

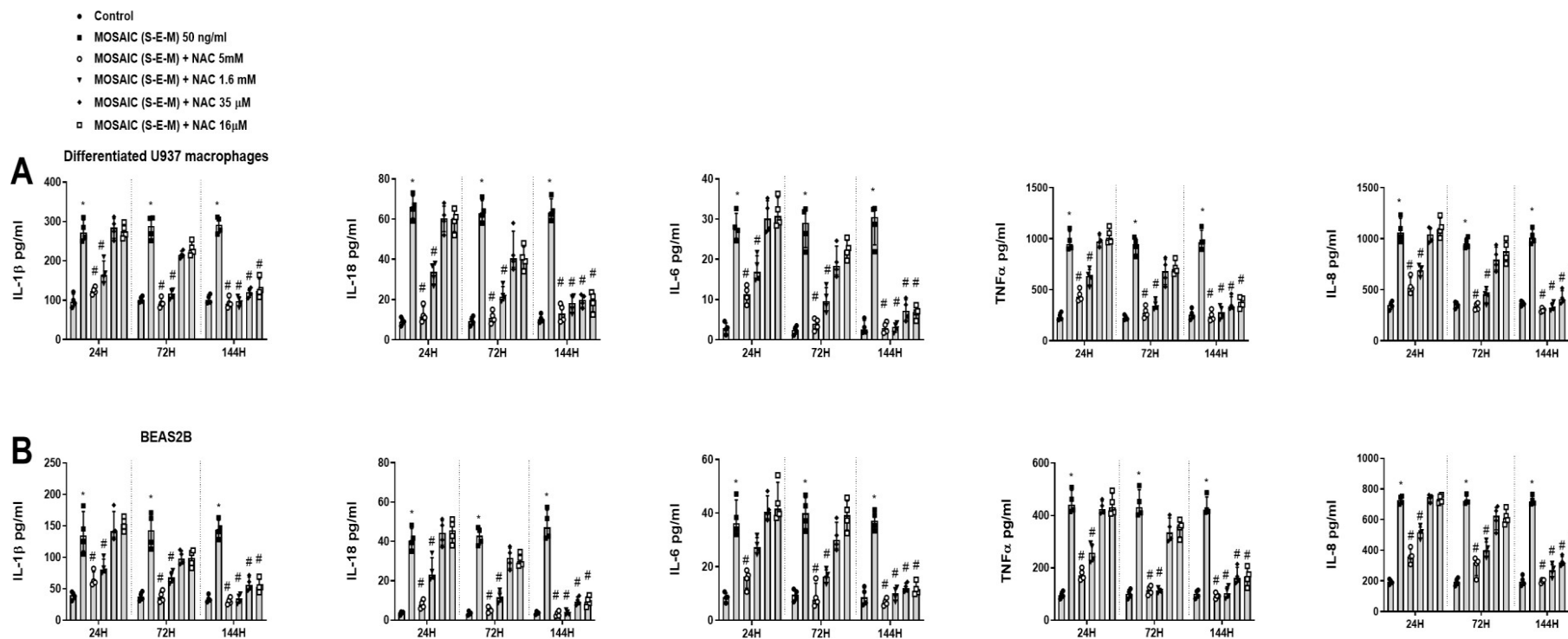


Figura 8. La N-acetilcisteina inibisce gli effetti del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) sulle citochine infiammatorie in maniera concentrata e dipendente dal tempo. (A) I macrofagi U937 differenziati e (B) l'epitelio bronchiale BEAS2B sono stati incubati con N-acetilcisteina (NAC) a 16 μM, 35 μM, 1,6 mM e 5 mM per 24 h, 72 h e 144 h, seguiti dalla stimolazione con il mosaico (S-E-M) 50 ng/mL per 24 h. I surnatanti delle cellule sono stati raccolti per misurare diverse citochine mediante ELISA. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti condotti in triplicato, con valori medi e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo. # $p < 0,05$ rispetto allo stimolo a mosaico (S-E-M).

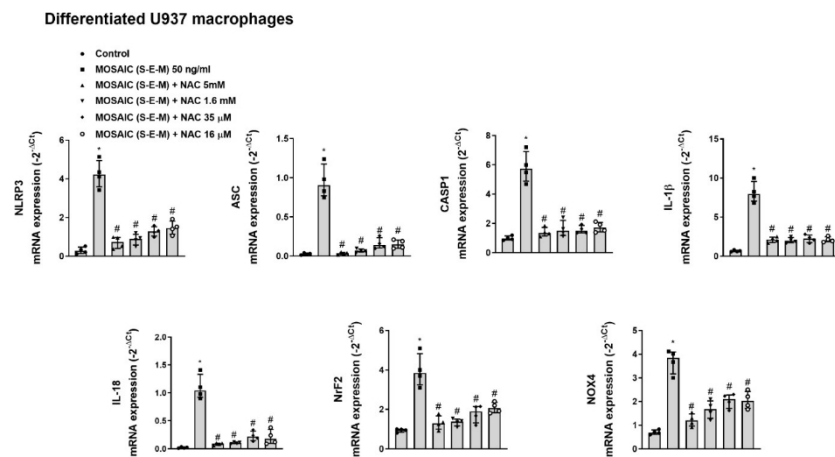


Figura 9. La N-acetilcisteina inibisce gli effetti del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) sui marcatori di espressione dell'inflammasoma e del redox mRNA nei macrofagi U937 differenziati. I macrofagi U937 differenziati sono stati incubati con N-acetilcisteina (NAC) a 16 μ M, 35 μ M, 1,6 mM e 5 mM per 144 ore, seguiti dalla stimolazione con il mosaico (S-E-M) 50 ng/mL per 24 ore. L'espressione dell'mRNA dei geni target è stata misurata mediante RT-qPCR. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti condotti in triplicato, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo. # $p < 0,05$ rispetto allo stimolo a mosaico (S-E-M).

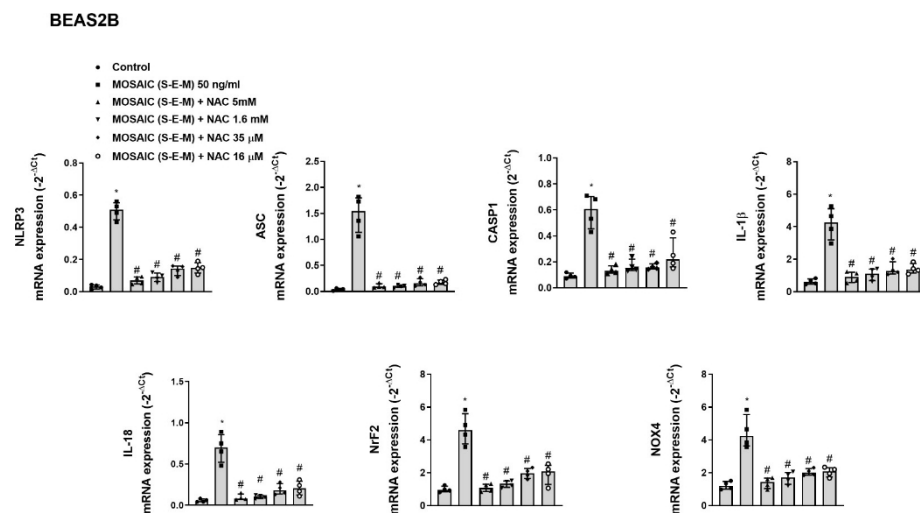


Figura 10. La N-acetilcisteina inibisce gli effetti del mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) sui marcatori di espressione dell'inflammasoma e del redox mRNA nelle cellule epiteliali bronchiali BEAS2B. Le cellule BEAS2B sono state incubate con N-acetilcisteina (NAC) a 16 μ M, 35 μ M, 1,6 mM e 5 mM per 144 ore, seguite dalla stimolazione con il mosaico (S-E-M) 50 ng/mL per 24 ore. L'espressione di mRNA dei geni target è stata misurata mediante RT-qPCR. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti condotti in triplicato, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0,05$ rispetto al controllo. # $p < 0,05$ rispetto allo stimolo a mosaico (S-E-M).

Differentiated U937 macrophages

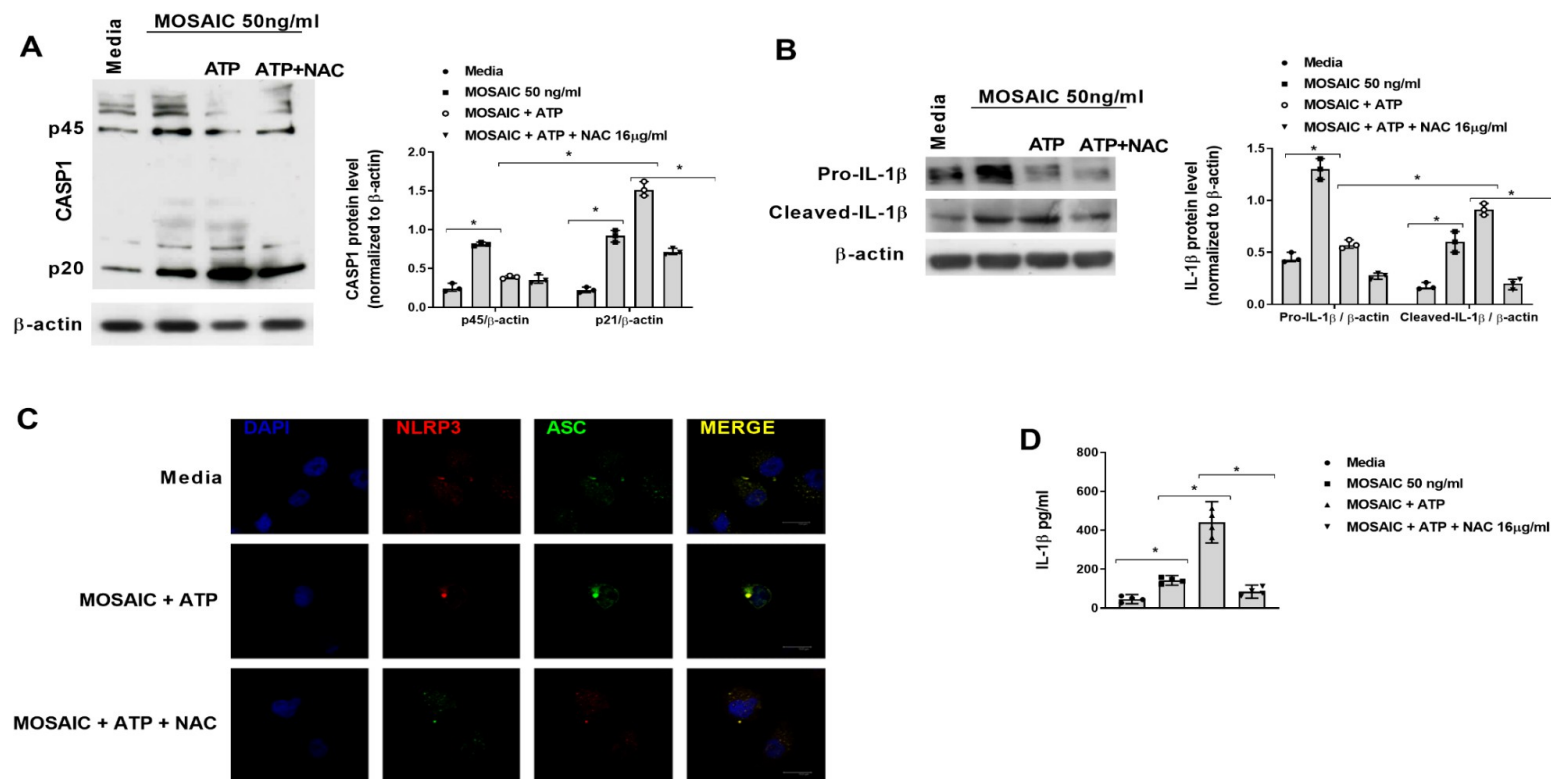


Figura 11. La N-acetilcisteina inibisce l'attivazione dell'inflammasoma nei macrofagi U937 umani differenziati. (A-D) I macrofagi U937 differenziati sono stati incubati con N-acetilcisteina (NAC) a 16 μM per 144 h, seguiti dalla stimolazione con la proteina ricombinante del mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) in presenza di NAC per 24 h. Al termine della stimolazione, è stato aggiunto ATP 5 mM per 1 h per stimolare l'assemblaggio e l'attivazione di NLRP3. (A) L'espressione proteica di diverse forme di CASP1 e (B) di IL-1β è stata analizzata mediante western blot e quantificata mediante densitometria. Sono mostrati i western blot rappresentativi di $n = 3$ esperimenti indipendenti.

(C) Analisi di immunofluorescenza della formazione di strutture punteggiate dell'inflammasoma NLRP3/ASC. (D) I livelli di IL-1β nel surnatante cellulare sono stati misurati mediante ELISA. Dati

sono presentati come scatter dot blot di $n = 3-4$ esperimenti indipendenti eseguiti in triplo, con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0.05$.

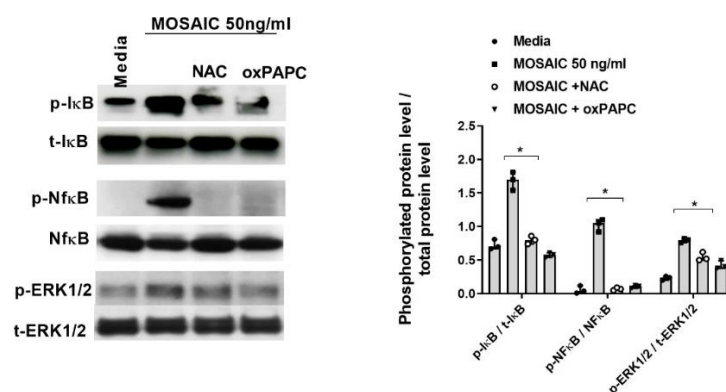


Figura 12. La N-acetilcisteina inibisce gli effetti della proteina del mosaico della SARS-CoV-2 (S-E-M) sull'attivazione di Nf-κB e ERK1/2. I macrofagi U937 differenziati sono stati incubati con N-acetilcisteina (NAC) a 16 μM per 144 h o con l'inibitore del TLR2 oxPAPC 30 μg/mL per 1 h, seguiti dalla stimolazione con la proteina ricombinante del mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) per 24 h. L'espressione proteica è stata misurata mediante western blot. Sono mostrati i blot rappresentativi di $n = 3$ esperimenti indipendenti. I dati sono presentati come scatter dot blot con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli. * $p < 0.05$.

2.5. Effetti della proteina SARS-CoV-2 a mosaico (S-E-M) sullo stress ossidativo, sui tioli e sul glutatione

Precedenti prove hanno dimostrato che la NAC può aumentare la produzione endogena di H₂S e reintegrare i pool di glutatione ridotto intracellulare (GSH), oltre ad avere effetti diretti di scavenger sulle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [29]. Tuttavia, non esistono prove degli effetti diretti delle proteine del SARS-CoV-2 su H₂S, GSH e ROS. In questo lavoro, abbiamo utilizzato la proteina ricombinante SARS-CoV-2 a mosaico (S-E-M) a una concentrazione di 50 ng/mL che ha mostrato proprietà pro-infiammatorie per analizzare gli effetti sullo stress ossidativo nei macrofagi U937 differenziati. A questo proposito, il mosaico (S-E-M) non ha aumentato i livelli di ROS intracellulari misurati come fluorescenza DCF in diversi punti temporali (1-24 h; Figura 13A). Inoltre, il mosaico (S-E-M) non ha modificato i tioli intracellulari (Figura 13B) e il GSH (Figura 13C), sebbene abbia mostrato una tendenza alla diminuzione. Questi risultati suggeriscono che la NAC ha effetti inibitori diretti sulla SARS-CoV-2 agendo sulle vie infiammatorie piuttosto che sullo stress ossidativo.

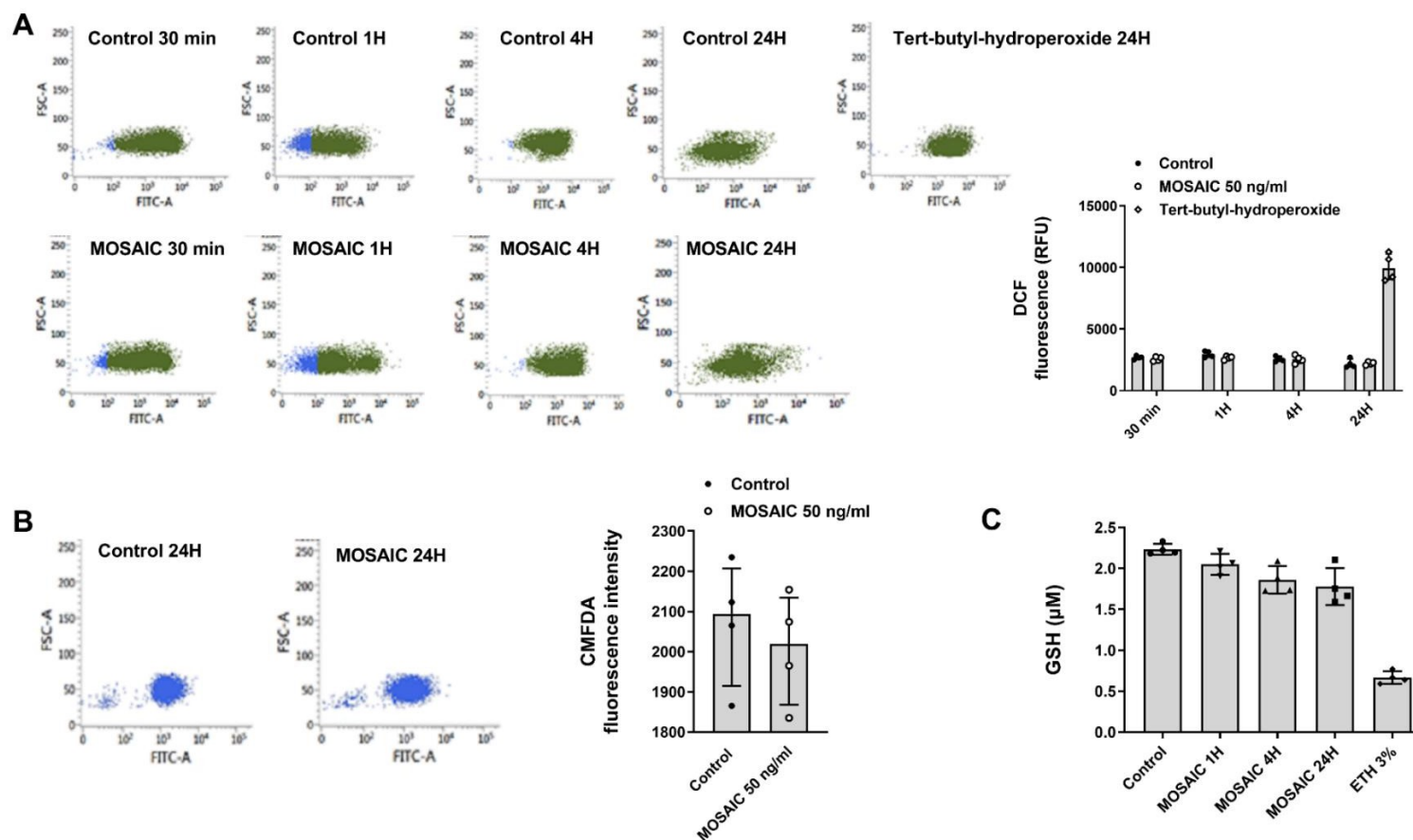


Figura 13. La proteina ricombinante del SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) non ha effetto sullo stress ossidativo, sui tioli e sul GSH nei macrofagi U937 differenziati. I macrofagi U937 differenziati sono stati stimolati con SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) 50 ng/mL per i tempi indicati. **(A)** Le specie reattive dell'ossigeno sono state misurate mediante citometria a flusso e quantificate con unità di fluorescenza relativa DCF. Sono mostrati i grafici rappresentativi. **(B)** I livelli di tiolo sono stati misurati con la citometria a flusso e **(C)** il GSH è stato misurato con il kit glutatione Assay come descritto nei metodi. I dati sono presentati come scatter dot blot di $n = 4$ esperimenti indipendenti con valori mediani e range interquartile. L'analisi statistica è stata effettuata con il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn per i confronti multipli.

3. Discussione

Il presente lavoro mostra nuove prove degli effetti della SARS-CoV-2 sull'attivazione dell'inflammasoma delle vie aeree nei pazienti COVID-19 gravemente malati, nonché la correlazione tra l'aumento dell'attivazione dell'inflammasoma e la gravità e la mortalità della COVID-19. In vitro, abbiamo dimostrato che la combinazione di proteine ricombinanti S, E e M del SARS-CoV-2 era in grado di attivare l'inflammasoma nei macrofagi e nelle cellule epiteliali bronchiali, aumentando il rilascio di mediatori pro-infiammatori attraverso un meccanismo che include l'attivazione di TLR2/MyD88/NfκB/ERK1/2. Inoltre, abbiamo dimostrato che grandi esposizioni a basse concentrazioni di NAC in vitro di 16 μM e 35 μM, corrispondenti ai livelli plasmatici raggiunti con somministrazioni orali di 600 mg e 1200 mg [30,31], sono state in grado di inibire l'attivazione dell'inflammasoma e l'infiammazione, il che potrebbe avere un valore potenziale come aggiunta di conoscenze scientifiche a sostegno dell'uso cronico di NAC nei pazienti COVID-19.

In questo lavoro, abbiamo selezionato pazienti critici vivi con varianti COVID-19 B.1 e B.1.1.7 VOC per studiare l'attivazione dell'inflammasoma nelle vie aeree al momento della tracheostomia e la sua associazione con l'infiammazione delle vie aeree, l'infiammazione sistemica, la mortalità ospedaliera e la mortalità a 28 giorni. Secondo i dati epidemiologici, il SARS-CoV-2 B.1.1.7 VOC (variante alfa) ha provocato un numero elevato di casi di COVID-19 con una mortalità superiore a quella osservata con la prima variante B.1 a Valencia, in Spagna [32]. I dati clinici dei pazienti inclusi in questo lavoro hanno mostrato un aumento dell'età, della mortalità a 28 giorni, dell'ipertensione e dei parametri infiammatori sierici, come CRP e LDH, nei pazienti B.1.1.7 VOC rispetto alla variante B.1. Tutti questi parametri clinici sono stati precedentemente studiati. Tutti questi parametri clinici sono stati precedentemente correlati con un'alta mortalità [33] nei pazienti COVID-19. In questa linea, l'espressione di alcuni componenti dell'infiammazione e l'attivazione dell'inflammasoma, misurata come strutture punteggiate NLRP3/ASC nel tessuto tracheale, è risultata più elevata nella variante B.1.1.7 VOC rispetto alla variante B.1.1.7.

B.1 e correlata con i valori sierici di CRP e LDH, che indicano un'infiammazione più grave che potrebbe essere guidata dall'attivazione dell'inflammasoma. È interessante notare che l'invecchiamento è stato collegato a una suscettibile elevazione dell'attivazione dell'inflammasoma, cioè dell'infiammazione [34], che consiste in bassi livelli sostenuti di infiammazione cronica dovuti all'età avanzata che potrebbero innescare e predisporre i pazienti COVID-19-anziani a un'iperattivazione dell'inflammasoma, spiegando, quasi in parte, la maggiore mortalità nei pazienti anziani. Questa ipotesi è stata sostenuta in questo lavoro dal fatto che l'espressione di NLRP3 nel tessuto delle vie aeree era positivamente correlata all'età dei pazienti.

Rapporti precedenti suggeriscono che l'infezione da SARS-CoV-2 sensibilizza l'NLRP3 [11,13] e che l'aumento dei livelli di IL-1β e IL-18 nel plasma è correlato alla gravità della malattia e alla mortalità nei pazienti con COVID-19 [35]. A questo proposito, l'infezione in vitro del SARS-CoV-2 può indurre l'attivazione dell'NLRP3 nei monociti del sangue periferico umano e l'NLRP3 è attivato nei monociti del sangue dei pazienti con COVID-19. Inoltre, l'attivazione di NLRP3 è stata dimostrata nel tessuto polmonare postmortem di pazienti con COVID-19, una condizione che potrebbe modificare l'espressione e l'attivazione di NLRP3 [11]. Tuttavia, a nostra conoscenza, non esistono dati sull'espressione e l'attivazione dell'NLRP3 nel tessuto delle vie aeree di pazienti vivi affetti da COVID-19, né dati relativi all'associazione tra l'inflammasoma NLRP3 delle vie aeree e la gravità e la mortalità della COVID-19. In questo lavoro, abbiamo presentato la prima evidenza sullo stato di NLRP3 nel tessuto delle vie aeree in diversi pazienti.

SARS-CoV-2, nonché la sua associazione positiva con la gravità della malattia e la mortalità, che rappresenta un aumento della conoscenza del meccanismo patologico legato alla malattia COVID-19.

Rapporti precedenti hanno dimostrato che i PAMP associati al SARS-CoV-2, come l'RNA a singolo filamento [36], l'ORF3a e la proteina N, possono attivare l'inflammasoma NLRP3 [37,38] in vitro. Inoltre, è stato dimostrato che la proteina E del SARS-CoV-2 promuove il segnale TLR2, ma non il TLR4, che regola l'espressione di NLRP3 e IL-1β nei macrofagi [28]. Tuttavia, altri autori hanno dimostrato che la proteina S ricombinante del SARS-CoV-2 aumenta

l'espressione della proteina NLRP3 e l'induzione di IL-1 β nei macrofagi di pazienti con COVID-19 attraverso l'attivazione a monte del TLR2 [32,39]. Per aumentare la complessità, l'analisi in silico ha dimostrato che TLR1, TLR4 e TLR6 legano la proteina S [40] e che la proteina S attiva il TLR4 nei macrofagi umani [41,42]. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, un'espe-

La spiegazione potrebbe essere che la SARS-CoV-2 causa uno squilibrio nell'efflusso di potassio intracellulare per attivare l'inflammasoma NLRP3 e il rilascio di IL-1 β e IL-18 [13]. Complessivamente, i dati attuali sono controversi e il ruolo di specifiche proteine del SARS-CoV-2 nell'innescare l'infiammazione rimane ancora da caratterizzare. In questo lavoro, abbiamo utilizzato basse concentrazioni di 50ng/mL di diverse proteine del SARS-CoV-2 che non hanno prodotto il rilascio di IL-1 β e IL-18. Tuttavia, la combinazione di S, E e E non ha prodotto il rilascio di IL-1 β . Tuttavia, la combinazione delle proteine S, E e M ha mostrato effetti sinergici attivando il rilascio di IL-1 β e IL-18 da parte dell'inflammasoma e delle citochine pro-infiammatorie IL-6, TNF- α e IL-8. Questa combinazione di proteine sembra avere il potenziale per indurre una risposta immunitaria infiammatoria innata, dal momento che il mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) ha riprodotto una risposta infiammatoria simile a quella dell'intera combinazione di proteine S, E e M. A questo proposito, la proteina ricombinante SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M), che contiene i re- gioni immunodominanti SARS-CoV-2 S, M ed E, fusi con un tag His al C-terminale, è stata selezionata in questo lavoro come modello approssimativo di stimolo in vitro, per l'analisi meccanicistica dell'infiammazione immunitaria innata del SARS-CoV-2. Quest'ultima opzione rappresenta una limitazione di questo studio, poiché le proteine ricombinanti non hanno permesso di riprodurre l'intera struttura del virus SARS-CoV-2, compresa la sua conformazione spaziale 4D, il che può limitare l'interpretazione dei risultati di questo manoscritto. Limitazioni simili sono state descritte per modelli virali/batterici in vitro, come il poli I:C dsRNA intracellulare [43], un agonista del TLR3 virale, o il lipopeptide triacilato sintetico Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4) come ligando del TLR2/TLR1 [44].

In questo lavoro, abbiamo osservato che il mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) ha aumentato l'asse NLRP3/ASC/CASP1 dell'inflammasoma e il rilascio di IL-1 β e IL-18 attraverso l'attivazione della segnalazione del TLR2. In termini di immunità innata, abbiamo dimostrato che TLR2 e il suo adattatore MyD88 erano sovraespressi nelle biopsie tracheali dei pazienti COVID-19, il che potrebbe contribuire all'esagerata attivazione dell'inflammasoma in COVID-19.

La sindrome iper-infiammatoria dei pazienti COVID-19 gravi è accompagnata da un elevato stress ossidativo [45]. Infatti, i livelli sierici di tioli antiossidanti e GSH, tra gli altri, sono diminuiti e inversamente correlati alla gravità della COVID-19, mentre le specie reattive nitriche e dell'ossigeno sono sovraesprese e correlate alla gravità della COVID-19 [45]. In questo lavoro, abbiamo valutato l'espressione e l'equilibrio tra il fattore di trascrizione antiossidante Nrf2 e la proteina di membrana cellulare ossidante NOX4, poiché l'aumento del rapporto NOX4/Nrf2 è stato associato alla fibrosi polmonare [46], importante sequela della COVID-19 [47]. Abbiamo osservato un aumento dell'espressione di Nrf2 e NOX4 nelle cellule epiteliali tracheali e nelle cellule infiammatorie infiltrate, ma un maggiore squilibrio redox NOX4/Nrf2, suggerendo che la sovraespressione dell'enzima NOX4, che genera specie reattive dell'ossigeno, ha superato la capacità di indurre l'Nrf2, come precedentemente evidenziato nei pazienti con fibrosi polmonare [46]. In condizioni fisiologiche, l'aumento dello stress ossidativo innalza l'attivazione di Nrf2 come meccanismo di compensazione. Al contrario, i pazienti COVID-19 positivi mostrano una diminuzione dei livelli sierici di Nrf2 e dello stato antiossidante totale e un aumento dei livelli sierici di NOX4, suggerendo che il SARS-CoV-2 potrebbe inattivare l'antiossidante Nrf2 [48,49]. Tuttavia, questi risultati sono stati descritti in campioni di siero, mentre non esistono dati sui tessuti delle vie aeree e sulle cellule infiammatorie. In questo lavoro abbiamo rilevato livelli elevati di Nrf2 nei pazienti COVID-19 rispetto a quelli non COVID-19 e abbiamo osservato che la proteina del mosaico SARS-CoV-2 (S-E-M) aumenta l'espressione di Nrf2 e NOX4 nei macrofagi e nelle cellule epiteliali bronchiali in vitro, attraverso l'attivazione del recettore TLR2. Tuttavia, non abbiamo rilevato un aumento diretto delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari indotte dal mosaico (S-E-M). Inoltre, sebbene la proteina mosaico (S-E-M) abbia ridotto leggermente i livelli di tioli e GSH, questa diminuzione non è stata statisticamente significativa. Una spiegazione di questi risultati apparentemente contraddittori potrebbe essere discussa dal fatto che la SARS-CoV-2 produce una risposta infiammatoria esagerata e queste proteine infiammatorie aumentano i livelli di ROS che sono in grado di aumentare l'infiammazione, producendo così un ciclo di feedback positivo. A questo proposito, i ROS possono attivare Nf- κ B e NLRP3,

aumentando ancora di più l'infiammazione [45]. Sebbene abbiamo osservato l'induzione di NOX4 da parte del mosaico (S-E-M) dopo 24 ore di stimolazione, le condizioni sperimentali e la lettura dei ROS (fino a 24 ore), insieme all'elevazione di Nrf2, possono spiegare la produzione di ROS in vitro non rilevabile.

In questo contesto, l'aumento dell'infiammazione e lo squilibrio redox nei pazienti con COVID-19 grave hanno suscitato l'interesse degli scienziati per diversi trattamenti antinfiammatori e potenzialmente antiossidanti. A questo proposito, la NAC è stata proposta come potenziale trattamento per la COVID-19 grazie alle sue proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e antivirali. Nei pazienti affetti da COVID-19, alte dosi di NAC (600-1200 mg/die) possono prevenire i sintomi gravi della COVID-19 in studi osservazionali e case-report, anche se sono stati riportati risultati negativi in studi interventistici, che hanno incoraggiato gli scienziati a condurre un ampio numero di studi clinici sulla NAC nei pazienti affetti da COVID-19, attualmente in corso [45]. Meccanicamente, la NAC è uno scavenger diretto dei ROS, una fonte di gruppi sulfidrilici (SH) che aumenta i gruppi tiolici e i livelli di GSH. Inoltre, modula diverse vie di segnalazione come p38, ERK1/2, SAPK/JNK, c-Jun e c-Fos [50] ed esercita alcuni effetti antinfiammatori attraverso l'inibizione di Nf- κ B [51]. Inoltre, è stato dimostrato che la NAC inibisce l'attivazione di NLRP3 [52]. È noto che i ROS attivano Nf- κ B che induce l'espressione di NLRP3. Inoltre, i ROS possono promuovere direttamente l'assemblaggio e l'attivazione di NLRP3 [45]. In questo lavoro abbiamo dimostrato per la prima volta gli effetti della NAC sull'inibizione dell'attivazione dell'inflammasoma NLRP3/ASC/CASP1 e IL-1 β /IL-18 indotta dalla proteina SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) e sull'inibizione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, IL-8 e TNF α in macrofagi umani e cellule epiteliali bronchiali. Gli effetti della NAC sull'attivazione NLRP3 indotta dal SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) sono stati mediati dall'inibizione di Nf- κ B, ma anche da effetti diretti, poiché la NAC ha inibito l'attivazione NLRP3/ASC/CASP1/IL-1 β indotta dall'ATP. Rapporti precedenti hanno rilevato che concentrazioni fisiologiche di tioli inibiscono l'attività dell'inflammasoma NLRP3 e riducono la produzione di citochine pro-infiammatorie in vitro e in vivo [53,54]. Pertanto, gli effetti inibitori della NAC sull'attivazione dell'NLRP3 indotta dal SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M) potrebbero essere mediati dall'aumento dei livelli di tioli. Inoltre, il virus della SARS-CoV-2 ha dimostrato di attivare gli inflammasomi canonici, tra cui la gasdermina D N-terminale che forma un poro della membrana cellulare per rilasciare IL-1 β e IL-18 all'esterno della cellula, nonché la piroptosi cellulare [55,56]. Inoltre, la NAC ha inibito l'attivazione dell'inflammasoma e della gasdermina D indotta dal bisfenolo A [57] o dal triossido di arsenico [58] rispettivamente negli osteociti e negli epatociti. In questo lavoro, la NAC ha inibito l'attivazione di CASP1 indotta dal SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M), necessaria per scindere e attivare la gasdermina D, pertanto è ragionevole pensare che l'N-acetilcisteina inibisca l'attivazione della gasdermina D indotta dal SARS-CoV-2 mosaico (S-E-M). I lavori futuri dovranno approfondire queste ipotesi.

In questo lavoro, non abbiamo osservato un aumento dei ROS dopo la stimolazione a mosaico (S-E-M), quindi gli effetti antinfiammatori della NAC osservati in questo lavoro possono essere indipendenti dalle sue proprietà antiossidanti. Infatti, lavori precedenti hanno dimostrato gli effetti inibitori della NAC sull'attivazione di Nf- κ B indipendentemente dai suoi effetti antiossidanti [59]. Oltre ai meccanismi studiati in questo lavoro, uno studio computazionale ha dimostrato che le sostanze chimiche a base di tioli possono spostare l'impalcatura redox della glicoproteina spike del SARS-CoV-2, inibendo l'infezione da SARS-CoV-2 [60].

Altri importanti risultati del presente lavoro sono l'aver dimostrato che basse concentrazioni croniche di NAC in vitro possono inibire l'inflammasoma. Per quanto riguarda i risultati in vitro, ci sono alcune controversie perché le dosi efficaci utilizzate nella letteratura scientifica sono di solito più alte (concentrazioni mM) rispetto alle concentrazioni plasmatiche raggiunte in vivo (concentrazioni μ M) [29,61]. Queste differenze si spiegano con la possibilità che in vivo il trattamento con NAC per un tempo prolungato mantenga la segnalazione e la trascrizione cellulare dipendente dal redox [62]. Pertanto, abbiamo ipotizzato che, analogamente a quanto accade in vivo, dosi basse e alte di NAC possano esercitare attività antinfiammatorie, ma la loro efficacia è influenzata dalla durata del trattamento. A questo proposito, abbiamo dimostrato che esposizioni croniche in vitro di NAC 16 μ M e 35 μ M, corrispondenti a livelli plasmatici successivi a 600 mg e 1200 mg di NAC per via orale [30,31], hanno mostrato gli stessi effetti antinfiammatori delle comuni concentrazioni di NAC in vitro di breve durata (1,6 mM e 5 mM) utilizzate in letteratura, che potrebbero essere più rappresentative in termini di informazioni traslazionali che richiedono ampi periodi di somministrazione di NAC nei pazienti

COVID-19. In sintesi, abbiamo mostrato nuove prove sulla

attivazione dell'inflammasoma nei pazienti COVID-19 gravemente malati, nonché la correlazione con l'attivazione dell'NLRP3 e la gravità. La combinazione delle proteine S-E-M della SARS-CoV-2 attiva la segnalazione del TLR2 aumentando l'attivazione di NF- κ B/ERK1/2 e dell'inflammasoma, che viene attenuata dalla NAC, suggerendo una spiegazione plausibile degli effetti benefici della NAC osservati nei pazienti COVID-19.

4. Materiali e metodi

4.1. Pazienti

I pazienti malati critici con diagnosi di COVID-19 sono stati reclutati nel Consorzio dell'Ospedale Universitario Generale di Valencia, in Spagna, nella prima ondata COVID-19 (dal 24 febbraio al 20 giugno 2020) caratterizzata dalla variante Sars-CoV-2 B.1 e nella terza ondata (dal 6 dicembre 2020 al 13 marzo 2021) caratterizzata dalla variante B.1.1.7 VOC (variante Alpha). Sono stati applicati i seguenti criteri di inclusione: (A) Criteri principali: (1) necessità di ventilazione meccanica invasiva, (2) shock (necessità di farmaci vasoattivi) e (B) criteri minori: (1) frequenza respiratoria >30 rpm, (2) PaFiO₂ <150 , (3) infiltrati multilobulari, (4) confusione, (5) disorientamento, (6) uremia >20 mg/dl, (7) leucopenia $<4000/\text{mm}^3$, (8) trombopenia $<100.000/\text{mm}^3$, (9) temperatura $<36,8$ °C, (10) ipotensione arteriosa che richiede una fluidoterapia aggressiva. Nei pazienti con COVID-19 ricoverati nell'unità di terapia critica, i pazienti intubati sono stati sottoposti a tracheostomia intorno al 10° giorno di intubazione, con l'intento di evitare lesioni laringee dovute al decubito causato dal tubo. È stato resecato un frammento tracheale che comprendeva 1-2 anelli tracheali a seconda dell'anatomia del paziente. Il frammento tracheale, che misura circa $15 \times 5-7$ mm, è stato trattato per estrarre l'RNA totale in condizioni protette o conservato in formaldeide per una successiva elaborazione. I pazienti malati critici con PCR negativa per SARS-CoV-2 e senza infezione delle vie respiratorie sono stati utilizzati come pazienti di controllo. Le caratteristiche cliniche dei pazienti COVID-19 gravemente malati sono descritte nella Tabella 1. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico locale di ricerca e indipendente dell'Ospedale Universitario Generale Consortile di Valencia (CEIC60/2020). È stato ottenuto il consenso informato scritto da ogni partecipante.

4.2. QRT-PCR in tempo reale e silenziamento genico

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il TriPure® Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). L'integrità dell'RNA estratto è stata confermata con il Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, Santa Clara, CA, USA). La trascrizione inversa è stata eseguita in 300 ng di RNA totale con un kit di reagenti per la trascrizione inversa TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Foster City, CA, USA). Il cDNA è stato amplificato con primer e sonde specifiche predefinite da Applied Biosystems per l'uomo: IL-1 β (Hs01555410_m1), IL-18 (Hs01038788_m1), NLRP3 (Hs00918082_m1), ASC (Hs00203118_m1), CASP1 (Hs00354836_m1), TLR2 (Hs00610101_m1), MyD88 (Hs00182082_m1), Nrf2 (Hs00975960_m1), NOX4 (Hs01379108_m1), in un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizzando Universal Master Mix (Applied Biosystems). L'espressione del gene target è stata espressa come incremento o decremento di una frazione rispetto all'espressione della β -actina come controllo endogeno (Applied Biosystems; Hs01060665). Il valore medio delle repliche per ciascun campione è stato calcolato ed espresso come soglia del ciclo (Ct). Il livello di espressione genica è stato quindi calcolato come la differenza (Δ Ct) tra il valore Ct del gene target e il valore Ct della β -actina. Le variazioni di ripiegamento dei livelli di mRNA del gene target sono state designate come $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

L'RNA interferente di piccole dimensioni (siRNA), compreso il controllo siRNA scrambled (identificativo n. 4390843), è stato acquistato da Ambion (Huntingdon, Cambridge, Regno Unito). Il siRNA mirato al gene TLR2 (n. di identificazione s107052) è stato progettato da Ambion. I monociti e le cellule epiteliali bronchiali umane (HBEC) sono stati trasfettati con il siRNA (50 nM) in terreno privo di siero e antibiotici. Dopo 6 ore, il terreno è stato aspirato e sostituito con terreno contenente siero per altre 42 ore prima della stimolazione cellulare. Il reagente di trasfezione utilizzato è stato la lipofectamina-2000 (Invitrogen, Paisley, UK) alla concentrazione finale di 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il knockdown di TLR2 è stato valutato nei monociti umani e nelle HBEC mediante RT-

PCR.

utilizzando primer TLR2 e la sonda descritta sopra. L'espressione di TLR2 negli esperimenti di knockdown di TLR2 era sempre inferiore al 10% dell'espressione di TLR2 nelle cellule di controllo con siRNA(-).

4.3. Studi immunoistochimici e di immunofluorescenza

L'istologia tracheale è stata condotta come precedentemente riportato [63]. Per l'analisi immunoistochimica della trachea umana, il tessuto è stato fissato, incorporato in paraffina e tagliato in sezioni (4-6 μm). Le sezioni tracheali sono state sottoposte a immuno-colorazione con il coniglio cleaved-IL-1 β (Asp116) (D3A3Z) (cell signaling, cat. n. 83186S), il coniglio cleaved caspase-1 (Asp297) (D57A2) (cell signaling, cat. n. 4199), il coniglio cleaved caspase-1 (Asp297) (D57A2) (D57A2) (D57A2) (D57A2). 4199), coniglio NLRP3 (D4D8T) (cell signaling, cat. n. 15101), coniglio ASC/TMS1 (E1E3I) (cell signaling, cat. n. 13833), TLR2 di topo (Novus Biologicals, cat. n. NBP1-51792B), MyD88 di coniglio (D80F5) (cell signaling, cat. n. 4283), NOX4 di coniglio (Novus Biologicals, cat. n. NB110-58849), NOX4 di coniglio (Novus Biologicals, cat. n. NB110-58849). NB110-58849), coniglio Nrf2 (Novus Biologicals, cat. NBP1-32822) e coniglio SARS-CoV-2 Spike (Abcam, cat. ab272504, Cambridge, UK) per 24 ore a 4 °C. Per l'immunoistochimica è stato utilizzato un sistema secondario Master polymer plus detection (perossidasi) (incl. cromogeno dab, Master diagnostica, cat. n. MAD-000237QK). Il controllo isotipico IgG di coniglio non immune (Sigma Aldrich cat. n. DUO87004, St. Louis, MO, USA) è stato utilizzato come controllo negativo e ha dato luogo a una colorazione negativa per tutti i campioni.

Le fette colorate sono state analizzate da un patologo in cieco al microscopio ottico Nikon Eclipse TE200 (Tokio, Giappone) e sono state scattate fotografie rappresentative (10 fette per paziente). L'intensità della colorazione è stata analizzata nell'epitelio e nella mucosa tracheale. L'intensità della colorazione per i diversi anticorpi è stata valutata su una scala da 0 a 3 (0, negativa; 1, debole; 2, moderata; 3, forte immunoreattività). La percentuale di cellule positive ai diversi anticorpi nella trachea umana è stata valutata su una scala da 1 a 4 come segue: 1, 0-25% di cellule positive; 2, 26-50% di cellule positive; 3, 51-75% di cellule positive; 4, 76-100% di cellule positive. I punteggi dell'intensità di colorazione e della percentuale di cellule immunoreattive sono stati poi moltiplicati per ottenere un punteggio composito da 0 a 12.

L'analisi di immunofluorescenza è stata eseguita per rilevare l'espressione e la distribuzione delle strutture punteggiate NLRP3 e ASC nella trachea umana. Il tessuto della trachea è stato fissato in paraformaldeide (4%) per 48 ore ed è stato incorporato in un composto per criosezione Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Europe BV, Leiden). I blocchi sono stati tagliati in sezioni di 10 μm di spessore, permeabilizzati in Triton X 100 (0,1% in PBS) per 5 minuti, bloccati con siero di capra al 10% in PBS e immunocolorati con NLRP3 di coniglio (D4D8T) (cell signaling, cat. n. 15101) o coniglio ASC/TMS1 (E1E3I) (cell signaling, cat. n. 13833) per 24 ore a 4 °C, seguito da un anticorpo secondario FITC o anti-IgG di coniglio coniugato con rodamina e infine da DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) per marcare i nuclei (Molecular Probes, Leiden, Paesi Bassi). La quantificazione del numero di strutture punteggiate NLRP3 e ASC per mm^2 è stata eseguita in 10 fette per paziente utilizzando un microscopio confocale spettrale Leica TCS SP2 con ingrandimento $\times 600$ e zoom 3 \times . Sono stati utilizzati laser rossi (HeNe 543 nm), verdi (HeNe 488 nm) e blu (Ar 351 nm, 364 nm).

4.4. Isolamento e coltura di cellule epiteliali bronchiali umane e cellule mononucleate

L'isolamento delle cellule epiteliali bronchiali umane è stato valutato come precedentemente descritto [64]. Piccoli pezzi di bronchi umani (0,5-1 mm di diametro interno) sono stati escissi da aree polmonari normali dal punto di vista microscopico, accuratamente sezionati dal parenchima polmonare e collocati su piastre di coltura rivestite di collagene (10 $\mu\text{g cm}^{-2}$ di collagene di ratto di tipo I (Sigma) in terreno di crescita epiteliale bronchiale (BEGM, composto da terreno basale epiteliale bronchiale (BEBM) integrato con singole citazioni (Lonza bioscience, Madrid, Spagna)). I piccoli bronchi sono stati orientati con lo strato epiteliale a contatto con la piastra di coltura. Dopo un periodo di ~1 settimana-12 giorni, sono state osservate cellule epiteliali bronchiali intorno ai bronchi.

L'identità del monostrato come cellule epiteliali bronchiali è stata affermata come precedentemente descritto [65]. La vitalità cellulare è stata valutata mediante analisi di esclusione del blu di tripan vitale utilizzando il contatore cellulare automatizzato Countness® (Life Technologies, Madrid, Spagna). La vitalità cellulare era >98% in tutte le colture cellulari testate in questo lavoro. La linea cellulare epiteliale bronchiale BEAS2B è stata ottenuta da

American Type Culture Collection e coltivate in terreno BEGM con integratori (Lonza, Madrid, Spagna) su piastre di coltura rivestite di collagene ($10 \mu\text{g cm}^{-2}$; collagene di tipo I di ratto) a 37°C con il 5% di CO_2 in aria umidificata. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 48 ore.

La linea cellulare monocitica umana U937 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) è stata coltivata in terreno RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) integrato con 10% di siero fetale bovino (FCS), 100 U/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomina a 37°C con il 5% di CO_2 in un incubatore umidificato. Le cellule U937 sono state incubate a 37°C con 5 nM di 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA; Sigma-Aldrich Co.). La linea cellulare monocitaria U937 è stata differenziata dopo 72 ore di incubazione con TPA in cellule macrofagiche come precedentemente descritto [66]. In queste condizioni, il fenotipo macrofago-simile è stato dimostrato sulla base dei marcatori della superficie cellulare, come la down-regulation di CD14 e l'up-regulation di esterasi NaF-insensibile e fosfatizzazione acida [67]. Le cellule sono state centrifugate e risospese in terreno fresco in piastre da 24 pozzetti a una concentrazione di 500×10^3 cellule per pozzetto per 24 ore prima dell'uso sperimentale.

4.5. Stimolazioni e condizioni in vitro

Per gli studi in vitro, HBEC e macrofagi differenziati 937 sono stati stimolati con diverse proteine ricombinanti del SARS-CoV-2, (1) nucleocapside ricombinante del SARS-CoV-2 (N) (Abcam, cat. n. ab273530), (2) proteina ricombinante della membrana (M) del SARS-CoV-2 (mybiosource, cat. n. MBS8574735), (3) proteina ricombinante dell'involucro (E) del SARS-CoV-2 (Abclonal, cat. n. RP01263LQ-100), (4) glicoproteina ricombinante S1 del SARS-CoV-2 (Abcam, ab272105), (5) glicoproteina ricombinante S2 del SARS-CoV-2 (Novus Biologicals, NBP2-90973) e (6) proteina ricombinante SARS-CoV-2 mosaico S-E-M (BioVendor R&D, cat. no. RP9720140250; che è una proteina ricombinante derivata da *Escherichia Coli* contenente le regioni immunodominanti del picco (S), della membrana (M) e dell'involucro (E) del SARS-CoV-2, fusa con un tag His al C-terminale) per i tempi indicati.

Le cellule sono state seminate e incubate con PAPC ossidato a $30 \mu\text{g/mL}$ (oxPAPC, TLR2

[28], InVivoGen, n. di catalogo tlr1-oxp1) o con concentrazioni crescenti di N-acetil-L-cisteina (NAC; Sigma: n. di catalogo A-7250) di $16 \mu\text{M}$, $35 \mu\text{M}$, $1,6 \text{ mM}$ e 5 mM per 24 h, 72 h e 144 h, seguite dalla stimolazione con le proteine ricombinanti della SARS-CoV-2. Dopo 24 ore di stimolazione cellulare, il terreno di coltura è stato raccolto e le IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF α e IL-8 sono state misurate utilizzando i kit Quantikine® ELISA disponibili in commercio (R&D Systems, Madrid, Spagna) secondo il protocollo del produttore.

In altri esperimenti, i macrofagi U937 differenziati sono stati incubati con NAC $16 \mu\text{M}$ per 144 h (sostituendo il terreno di coltura e la NAC ogni 24 h), seguiti dalla stimolazione con la proteina ricombinante SARS-CoV-2 MOSAIC in presenza di NAC per 24 h. Al termine della stimolazione, è stato aggiunto ATP 5 mM (Sigma Aldrich, cat. n. A6419) per 1h per stimolare l'assemblaggio e l'attivazione di NLRP3.

4.6. Western Blot

L'analisi Western blotting è stata utilizzata per rilevare i cambiamenti nell'espressione proteica dei macrofagi U937 umani differenziati. Le cellule sono state omogeneizzate da una fiasca confluyente di 25 m^2 e lisate in ghiaccio con un tampone di lisi comprendente un cocktail di inibitori completo più 1 mM di acido etilendiamminotetraacetico (Roche Diagnostics Ltd., West Sussex, Regno Unito) con 20 mM di Tris base, $0,9\%$ di NaCl, $0,1\%$ di Triton X-100, 1 mM di ditiotretolo e 1 mg/mL di pepstatina.

A. Il saggio Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd., Herts, Regno Unito) è stato utilizzato secondo le istruzioni del produttore per quantificare il livello di proteine in ogni campione e garantire un carico proteico uguale. L'elettroforesi su gel di sodio dodecil solfato-poliacrilammide è stata utilizzata per separare le proteine in base al loro peso molecolare. In breve, $15 \mu\text{g}$ di proteine (denaturate) insieme a un marcatore di peso molecolare (marcatore Bio-Rad Kaleidoscope; Bio-Rad Laboratories) sono stati caricati su un gel di acrilammide costituito da un gel di stacking di acrilammide al 5% sovrapposto a un gel di risoluzione di acrilammide al 10% e fatti scorrere attraverso il gel

applicando 100 V per 1 h. Le proteine sono state trasferite dal gel a un gel di polivinilidene.

membrana di difluoruro utilizzando un metodo di wet-blotting. La membrana è stata bloccata con il 5% di Marvel in PBS contenente lo 0,1% di Tween20 (PBS-T) ed è stata testata con i seguenti anticorpi: Rabbit anti-caspase 1 (Sigma Aldrich, cat. n. SAB5700660), rabbit anti-cleaved IL-1 β (forma matura) (Cell Signaling, cat. n. 83186), rat anti-IL-1 β (pro-forma) (ThermoFisher, cat. n. 17-7114-80), rabbit phospho-I κ B (Ser 32, Cell Signaling, cat. n. 2859), I κ B totale di coniglio (Cell Signaling, cat. no. 4812), NF- κ B di coniglio (Abcam, cat. no. ab16502), p-NF- κ B di coniglio (Abcam, cat. no. ab86299), p-ERK1/2 di topo (Sigma-Aldrich, cat. n. M-9692), ERK1/2 di coniglio (Cell Signaling, cat. n. 4695) e β -actina (Sigma-Aldrich, cat. n. A1978). Per rilevare le proteine marcate è stato utilizzato il metodo della chemiluminescenza potenziata con reagenti di chemiluminescenza potenziata (ECL Plus; Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Regno Unito). La densitometria delle pellicole è stata eseguita con il software Image J 1.42q (disponibile all'indirizzo <http://rsb.info.nih.gov/ij/> (visitato il 24 ottobre 2022), USA). I risultati dell'espressione delle proteine target sono espressi come rapporto tra la forma non fosforilata e la densitometria dei controlli endogeni β -actina.

4.7. CM-H2DCFDA Misura in fluorescenza delle specie reattive dell'ossigeno

Il clorometile 2', 7'-diclorodifluoresceina diacetato (CM-H2DCF-DA, Invitrogen, Paisley, UK) è un composto permeabile alle cellule che, in seguito all'idrolisi dell'estere intracellulare, viene ossidato a 2', 7'-diclorofluoresceina (DCF) da O₂ - e H O₂₂, e può quindi essere utilizzato per monitorare la generazione intracellulare di ROS [68]. Per quantificare i livelli di ROS, i macrofagi U937 differenziati sono stati lavati due volte con PBS e incubati per 30 minuti con 50 μ M CM-H2DCF-DA diluiti in Opti-MEM. Quindi, le cellule sono state nuovamente lavate due volte con PBS per rimuovere la CM-H2DCF-DA rimanente e stimolate con la proteina ricombinante SARS-CoV-2 MOSAIC a tempi diversi, come indicato. L'idroperossido di terz-butile a 0,77 mM è stato usato come controllo positivo. L'intensità della fluorescenza è stata analizzata mediante citometria a flusso (FACSVerse; BD Biosciences, Madrid, Spagna). Sono state analizzate almeno 10.000 cellule per campione con il software standard Flow-Jo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). I risultati sono stati espressi come intensità di fluorescenza ROS, che indica la fluorescenza DCF in unità di fluorescenza relativa (RFU).

4.8. CM-FDA Misura della fluorescenza dei tioli

Per quantificare i livelli totali di tiolo intracellulare, i macrofagi U937 differenziati sono stati stimolati con la proteina ricombinante SARS-CoV-2 MOSAIC. Al termine dell'esperimento, le cellule sono state raccolte, lavate con PBS e sospese in 12,5 μ M di 5-clorometilfluoresceina diacetato (5-CM-FDA) (Invitrogen, Paisley, UK) per 15 minuti. Quindi, le cellule sono state lavate e l'intensità della fluorescenza è stata analizzata mediante citometria a flusso (FACSVerse; BD Biosciences, Madrid, Spagna). Un minimo di 10.000 cellule per campione sono state analizzate con il software standard Flow-Jo (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). I risultati sono stati espressi come intensità di fluorescenza che indica la fluorescenza di CMFDA in unità di fluorescenza relativa.

4.9. Misura del GSH

Secondo le istruzioni del produttore, è stato utilizzato il kit GSH-Glo™ Glutathione Assay (Promega, cat. n. TB369, Madison, WI, USA), un saggio basato sulla luminescenza per il rilevamento e la quantificazione del glutathione. Questo test si basa sulla conversione di un derivato della luciferina in luciferina in presenza di glutathione catalizzato dalla glutathione-S-transferasi (GST).

4.10. Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante analisi non parametrica. $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. I dati sono stati visualizzati come valori mediani e range interquartile. Quando i confronti riguardavano più di due gruppi, è stata eseguita prima un'analisi della varianza (test di Kruskal-Wallis). Nel caso di una differenza globale significativa, i confronti tra i gruppi sono stati valutati con il test post hoc di Dunn, che generalizza la procedura di aggiustamento di Bonferroni. Quando i confronti riguardavano solo due gruppi,

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il test di Mann-Whitney. La correlazione è stata analizzata con l'analisi non parametrica di Spearman ρ .

Contributi degli autori: Concettualizzazione, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; metodologia, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; software, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; convalida, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; analisi formale, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; indagine, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; risorse, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; cura dei dati, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; redazione della bozza originale, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; redazione-revisione ed editing, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; visualizzazione, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; supervisione, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; progetto amministrazione, J.M., F.M.-E., P.M., I.R., P.R., M.A.B., M.N.O.-K., J.R.A.-G., E.Z. e J.C.; finanziamento acquisizione, J.M. e J.C. Tutti gli autori hanno letto e approvato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamenti: Questo lavoro è stato sostenuto dalle sovvenzioni PID2020-114871RB-I00 (JC), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), e Instituto de salud carlos III FIS PI20/01363 (JM), CIBERES gruppo 13 (CB06/06/0027) del governo spagnolo e da borse di ricerca del governo regionale Prometeo 2017/023/UV (J.C.), della "Generalitat Valenciana". Gli enti finanziatori non hanno contribuito al disegno dello studio o alla raccolta, all'analisi e all'interpretazione dei dati, né alla stesura del manoscritto.

Dichiarazione dell'Institutional Review Board: Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e il protocollo è stato approvato dal comitato etico di ricerca locale e indipendente dell'Ospedale Universitario Generale Consortile di Valencia (CEIC60/2020). È stato ottenuto il consenso informato scritto da ogni partecipante.

Dichiarazione di consenso informato: Tutti i soggetti coinvolti nello studio hanno ottenuto il consenso informato.

Dichiarazione di disponibilità dei dati: I dati presentati in questo studio sono disponibili su richiesta all'autore corrispondente.

Conflitti di interesse: Gli autori non dichiarano alcun conflitto di interesse. I finanziatori non hanno avuto alcun ruolo nella progettazione dello studio, nella raccolta, analisi o interpretazione dei dati, nella stesura del manoscritto o nella decisione di pubblicare i risultati.

Riferimenti

- Berlin, D.A.; Gulick, R.M.; Martinez, F.J. Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2451-2460. [[CrossRef](#)]
- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Caratteristiche cliniche dei pazienti infettati con il nuovo coronavirus 2019 a Wuhan, Cina. *Lancet* **2020**, *395*, 497-506. [[CrossRef](#)]
- Consortium, W.H.O.S.T.; Pan, H.; Peto, R.; Henao-Restrepo, A.M.; Preziosi, M.P.; Sathiyamoorthy, V.; Abdool Karim, Q.; Alejandria, M.M.; Hernandez Garcia, C.; Kieny, M.P.; et al. Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19-Interim WHO Solidarity Trial Results. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 497-511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Group, R.C.; Horby, P.; Lim, W.S.; Emberson, J.R.; Mafham, M.; Bell, J.L.; Linsell, L.; Staplin, N.; Brightling, C.; Ustianowski, A.; et al. Desametasone in pazienti ospedalizzati con Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693-704.
- Investigatori, R.-C.; Gordon, A.C.; Mouncey, P.R.; Al-Beidh, F.; Rowan, K.M.; Nichol, A.D.; Arabi, Y.M.; Annane, D.; Beane, A.; van Bentum-Puijk, W.; et al. Antagonisti del recettore dell'interleuchina-6 in pazienti critici con COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1491-1502. [[CrossRef](#)]
- Kalil, A.C.; Patterson, T.F.; Mehta, A.K.; Tomashek, K.M.; Wolfe, C.R.; Ghazaryan, V.; Marconi, V.C.; Ruiz-Palacios, G.M.; Hsieh, L.; Kline, S.; et al. Baricitinib più Remdesivir per gli adulti ospedalizzati con Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 795-807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rosas, I.O.; Brau, N.; Waters, M.; Go, R.C.; Hunter, B.D.; Bhagani, S.; Skiest, D.; Aziz, M.S.; Cooper, N.; Douglas, I.S.; et al. Tocilizumab in pazienti ricoverati con polmonite grave da covirus. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 1503-1516. [[CrossRef](#)]
- Tomazini, B.M.; Maia, I.S.; Cavalcanti, A.B.; Berwanger, O.; Rosa, R.G.; Veiga, V.C.; Avezum, A.; Lopes, R.D.; Bueno, F.R.; Silva, M.; et al. Effetto del desametasone sui giorni di vita e di assenza di ventilatore in pazienti con sindrome da distress respiratorio acuto moderato o grave e COVID-19: Lo studio clinico randomizzato CoDEX. *JAMA* **2020**, *324*, 1307-1316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tay, M.Z.; Poh, C.M.; Renia, L.; MacAry, P.A.; Ng, L.F.P. La trinità di COVID-19: Immunità, infiammazione e intervento. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 363-374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Del Valle, D.M.; Kim-Schulze, S.; Huang, H.H.; Beckmann, N.D.; Nirenberg, S.; Wang, B.; Lavin, Y.; Swartz, T.H.; Madduri, D.; Stock, A.; et al. Una firma di citochine infiammatorie predice la gravità e la sopravvivenza del COVID-19. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1636-1643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Rodrigues, T.S.; de Sa, K.S.G.; Ishimoto, A.Y.; Becerra, A.; Oliveira, S.; Almeida, L.; Goncalves, A.V.; Perucello, D.B.; Andrade, W.A.; Castro, R.; et al. Gli inflammasomi sono attivati in risposta all'infezione da SARS-CoV-2 e sono associati alla gravità di COVID-19 nei pazienti di . *J. Exp. Med.* **2021**, *218*, e20201707. [[CrossRef](#)]
12. Sefik, E.; Qu, R.; Junqueira, C.; Kaffe, E.; Mirza, H.; Zhao, J.; Brewer, J.R.; Han, A.; Steach, H.R.; Israelow, B.; et al. L'attivazione dell'inflammasoma nei macrofagi infetti guida la patologia del COVID-19. *Nature* **2022**, *606*, 585-593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ferreira, A.C.; Soares, V.C.; de Azevedo-Quintanilha, I.G.; Dias, S.; Fintelman-Rodrigues, N.; Sacramento, C.Q.; Mattos, M.; de Freitas, C.S.; Temerozo, J.R.; Teixeira, L.; et al. Il SARS-CoV-2 coinvolge l'inflammasoma e la piroptosi nei monociti primari umani. *Cell Death Discov.* **2021**, *7*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tosato, G.; Jones, K.D. L'interleuchina-1 induce la produzione di interleuchina-6 nei monociti del sangue periferico. *Blood* **1990**, *75*, 1305-1310. [[CrossRef](#)]
15. Broz, P.; Dixit, V.M. Inflammasomi: Meccanismo di assemblaggio, regolazione e segnalazione. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 407-420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Diamond, M.S.; Kanneganti, T.D. Immunità innata: La prima linea di difesa contro la SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.* **2022**, *23*, 165-176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bourgonje, A.R.; Offringa, A.K.; van Eijk, L.E.; Abdulle, A.E.; Hillebrands, J.L.; van der Voort, P.H.J.; van Goor, H.; van Hezik, E.J. N-Acetylcysteine and Hydrogen Sulfide in Coronavirus Disease 2019. *Antioxid. Redox Signal.* **2021**, *35*, 1207-1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Renieris, G.; Katrini, K.; Damoulari, C.; Akinosoglou, K.; Psarrakis, C.; Kyriakopoulou, M.; Dimopoulos, G.; Lada, M.; Koufargyris, P.; Giamarellos-Bourboulis, E.J. Serum Hydrogen Sulfide and Outcome Association in Pneumonia by the SARS-CoV-2 Coronavirus. *Shock* **2020**, *54*, 633-637. [[CrossRef](#)]
19. Polonikov, A. La carenza endogena di glutatione come causa più probabile delle manifestazioni gravi e del decesso nei pazienti affetti da COVID-19 . *ACS Infect. Dis.* **2020**, *6*, 1558-1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. De Flora, S.; Balansky, R.; La Maestra, S. Razionale per l'uso dell'N-acetilcisteina nella prevenzione e nella terapia adiuvante della COVID-19. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2020**, *34*, 13185-13193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mata, M.; Morcillo, E.; Gimeno, C.; Cortijo, J. La N-acetil-L-cisteina (NAC) inibisce la sintesi di mucina e i mediatori pro-infiammatori nelle cellule epiteliali alveolari di tipo II infettate con i virus influenzali A e B e con il virus respiratorio sinciziale (RSV). *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 548-555. [[CrossRef](#)]
22. Poe, F.L.; Corn, J. N-acetilcisteina: Un potenziale agente terapeutico per la SARS-CoV-2. *Med. Hypotheses* **2020**, *143*, 109862. [[CrossRef](#)]
23. Alamdari, D.H.; Moghaddam, A.B.; Amini, S.; Keramati, M.R.; Zarmehri, A.M.; Alamdari, A.H.; Damsaz, M.; Banpour, H.; Yarahmadi, A.; Koliakos, G. Applicazione di blu di metilene -vitamina C -N-acetilcisteina per il trattamento di pazienti COVID-19 gravemente malati, rapporto di uno studio clinico di fase-I. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *885*, 173494. [[CrossRef](#)]
24. Chen, G.; Lu, H. Acetilcisteina orale ad alte dosi: Efficace contro la variante Omicron del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2)? *Drug Discov. Ther.* **2022**, *16*, 139-141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. de Alencar, J.C.G.; Moreira, C.L.; Muller, A.D.; Chaves, C.E.; Fukuhara, M.A.; da Silva, E.A.; Miyamoto, M.F.S.; Pinto, V.B.; Bueno, C.G.; Lazar Neto, F.; et al. Studio in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo con N-acetilcisteina per il trattamento della sindrome respiratoria acuta grave causata da Coronavirus 2019 (COVID-19). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2021**, *72*, e736-e741. [[CrossRef](#)]
26. Ibrahim, H.; Perl, A.; Smith, D.; Lewis, T.; Kon, Z.; Goldenberg, R.; Yarta, K.; Staniloae, C.; Williams, M. Blocco terapeutico dell'infiammazione nella grave infezione da COVID-19 con N-acetilcisteina per via endovenosa. *Clin. Immunol.* **2020**, *219*, 108544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Izquierdo, J.L.; Soriano, J.B.; Gonzalez, Y.; Lumbreras, S.; Ancochea, J.; Echeverry, C.; Rodriguez, J.M. Uso di N-Acetilcisteina ad alte dosi come trattamento orale per i pazienti ricoverati con COVID-19. *Sci. Prog.* **2022**, *105*, 368504221074574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Zheng, M.; Karki, R.; Williams, E.P.; Yang, D.; Fitzpatrick, E.; Vogel, P.; Jonsson, C.B.; Kanneganti, T.D. TLR2 percepisce la proteina dell'involucro del SARS-CoV-2 per produrre citochine infiammatorie. *Nat. Immunol.* **2021**, *22*, 829-838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sadowska, A.M.; Manuel, Y.K.B.; De Backer, W.A. Efficacia antiossidante e antinfiammatoria della NAC nel trattamento della BPCO: Effetti discordanti in vitro e in vivo: Una revisione. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2007**, *20*, 9-22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Allegra, L.; Dal Sasso, M.; Bovio, C.; Massoni, C.; Fonti, E.; Braga, P.C. I burst ossidativi dei neutrofili umani e la loro modulazione in vitro con diverse concentrazioni di N-acetilcisteina. *Arzneim. Forsch.* **2002**, *52*, 669-676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Tsikas, D.; Sandmann, J.; Ikic, M.; Fauler, J.; Stichtenoth, D.O.; Frolich, J.C. Analisi della cisteina e della N-acetilcisteina nel plasma umano mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni allo stato basale e dopo somministrazione orale di N-acetilcisteina. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1998**, *708*, 55-60. [[CrossRef](#)]
32. Troyano-Hernaez, P.; Reinoso, R.; Holguin, A. Evoluzione del SARS-CoV-2 in Spagna durante i primi due anni della pandemia: Varianti circolanti, conservazione degli aminoacidi e variabilità genetica nelle proteine strutturali, non strutturali e accessorie. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Ramon, A.; Torres, A.M.; Milara, J.; Cascon, J.; Blasco, P.; Mateo, J. Metodo basato su eXtreme Gradient Boosting per classificare i pazienti con COVID-19. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* **2022**, *70*, 1472-1480. [[CrossRef](#)]
34. Cyr, B.; Hadad, R.; Keane, R.W.; de Rivero Vaccari, J.P. The Role of Non-canonical and Canonical Inflammasomes in Inflammaging. *Fronte. Mol. Neurosci.* **2022**, *15*, 774014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Laing, A.G.; Lorenc, A.; Del Molino Del Barrio, I.; Das, A.; Fish, M.; Monin, L.; Munoz-Ruiz, M.; McKenzie, D.R.; Hayday, T.S.; Francos-Quijorna, I.; et al. Una firma immunitaria COVID-19 dinamica include associazioni con prognosi sfavorevoli. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1623-1635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Campbell, G.R.; To, R.K.; Hanna, J.; Spector, S.A. Sequenze di ssRNA derivate da SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 e HIV-1 attivano l'inflammasoma NLRP3 nei macrofagi umani attraverso un percorso non classico. *iScience* **2021**, *24*, 102295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Pan, P.; Shen, M.; Yu, Z.; Ge, W.; Chen, K.; Tian, M.; Xiao, F.; Wang, Z.; Wang, J.; Jia, Y.; et al. La proteina N del SARS-CoV-2 promuove l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 per indurre iperinfiammazione. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Xu, H.; Akinyemi, I.A.; Chitre, S.A.; Loeb, J.C.; Lednicky, J.A.; McIntosh, M.T.; Bhaduri-McIntosh, S. La viroporina del SARS-CoV-2 codificata dall'ORF3a innesca la via infiammatoria NLRP3. *Virologia* **2022**, *568*, 13-22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Khan, S.; Shafiei, M.S.; Longoria, C.; Schoggins, J.W.; Savani, R.C.; Zaki, H. La proteina spike del SARS-CoV-2 induce l'infiammazione attraverso l'attivazione TLR2-dipendente della via NF-kappaB. *eLife* **2021**, *10*, e68563. [[CrossRef](#)]
40. Choudhury, A.; Mukherjee, S. Studi in silico sulla caratterizzazione comparativa delle interazioni della glicoproteina spike del SARS-CoV-2 con gli omologhi del recettore ACE-2 e i TLR umani. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 2105-2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Shirato, K.; Kizaki, T. La subunità S1 della proteina spike del SARS-CoV-2 induce risposte pro-infiammatorie attraverso la segnalazione del recettore toll-like 4 nei macrofagi murini e umani. *Heliyon* **2021**, *7*, e06187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhao, Y.; Kuang, M.; Li, J.; Zhu, L.; Jia, Z.; Guo, X.; Hu, Y.; Kong, J.; Yin, H.; Wang, X.; et al. La proteina spike del SARS-CoV-2 interagisce con e attiva il TLR41. *Cell Res.* **2021**, *31*, 818-820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alexopoulou, L.; Holt, A.C.; Medzhitov, R.; Flavell, R.A. Riconoscimento di RNA a doppio filamento e attivazione di NF-kappaB da parte del recettore Toll-like 3 di . *Nature* **2001**, *413*, 732-738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Brandt, K.J.; Fickentscher, C.; Kruihof, E.K.; de Moerloose, P. I ligandi del TLR2 inducono l'attivazione di NF-kappaB dai compartimenti endosomiali dei monociti umani. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tsermpini, E.E.; Glamoclija, U.; Ulucan-Karnak, F.; Redensek Trampuz, S.; Dolzan, V. Meccanismi molecolari relativi alle risposte allo stress ossidativo e alle terapie antiossidative in COVID-19: A Systematic Review. *Antiossidanti* **2022**, *11*, 1609. [[CrossRef](#)]
46. Hecker, L.; Logsdon, N.J.; Kurundkar, D.; Kurundkar, A.; Bernard, K.; Hock, T.; Meldrum, E.; Sanders, Y.Y.; Thannickal, V.J. Inversione della fibrosi persistente nell'invecchiamento mediante il bersaglio dello squilibrio redox Nox4-Nrf2. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 231ra47. [[CrossRef](#)]
47. Lee, J.H.; Yim, J.J.; Park, J. Funzionalità polmonare e anomalie della tomografia computerizzata del torace 6-12 mesi dopo il recupero da COVID-19: Una revisione sistematica e una meta-analisi. *Respir. Res.* **2022**, *23*, 233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gumus, H.; Erat, T.; Ozturk, I.; Demir, A.; Koyuncu, I. Stress ossidativo e diminuzione del livello di Nrf2 nei pazienti pediatrici con COVID-19. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 2259-2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yildiz, H.; Alp, H.H.; Ekin, S.; Arisoy, A.; Gunbatar, H.; Asker, S.; Cilingir, B.M.; Sunnetcioglu, A.; Celikel, M.; Esen, N.; et al. Analisi dei marcatori di danno ossidativo endogeno e associazione con la gravità dell'interessamento polmonare in pazienti con polmonite da SARS-CoV-2. *Infect. Dis. Now* **2021**, *51*, 429-434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zafarullah, M.; Li, W.Q.; Sylvester, J.; Ahmad, M. Meccanismi molecolari delle azioni della N-acetilcisteina. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2003**, *60*, 6-20. [[CrossRef](#)]
51. Oka, S.; Kamata, H.; Kamata, K.; Yagisawa, H.; Hirata, H. La n-acetilcisteina sopprime l'attivazione di NF-kappaB indotta da TNF attraverso l'inibizione delle chinasi IkappaB. *FEBS Lett.* **2000**, *472*, 196-202. [[CrossRef](#)]
52. Hu, X.; Cheng, L.; Wang, X.; Luo, G.; Zhao, T.; Tian, J.; An, L. La n-acetil-l-cisteina protegge dallo stress termico gli ovociti suini in fase di ripresa meiotica . *Reprod. Toxicol.* **2020**, *91*, 27-34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Castelblanco, M.; Lugrin, J.; Ehrichtou, D.; Nasi, S.; Ishii, I.; So, A.; Martinon, F.; Busso, N. L'idrogeno solforato inibisce l'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 e riduce la produzione di citochine sia in vitro che in un modello murino di infiammazione. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 2546-2557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Yue, L.M.; Gao, Y.M.; Han, B.H. Valutazione dell'effetto dell'idrogeno solforato sulla via di segnalazione NLRP3 e del suo coinvolgimento nella patogenesi dell'aterosclerosi. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 481-492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Liu, X.; Ding, S.; Liu, P. Il ruolo della gasdermina D nell'infezione e nell'evasione dei coronavirus. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 784009. [[CrossRef](#)]
56. Silva, C.M.S.; Wanderley, C.W.S.; Veras, F.P.; Goncalves, A.V.; Lima, M.H.F.; Toller-Kawahisa, J.E.; Gomes, G.F.; Nascimento, D.C.; Monteiro, V.V.S.; Paiva, I.M.; et al. L'attivazione della gasdermina-D da parte del SARS-CoV-2 innesca il NET e media l'immunopatologia del COVID-19. *ogy. Crit. Care* **2022**, *26*, 206. [[CrossRef](#)]
57. Zhang, Y.; Yan, M.; Shan, W.; Zhang, T.; Shen, Y.; Zhu, R.; Fang, J.; Mao, H. Il bisfenolo A induce la morte cellulare pirototica attraverso ROS/NLRP3/Caspase-1 negli osteociti MLO-Y4. *Food Chem. Toxicol.* **2022**, *159*, 112772. [[CrossRef](#)]
58. Zhong, G.; Wan, F.; Ning, Z.; Wu, S.; Jiang, X.; Tang, Z.; Huang, R.; Hu, L. Il ruolo protettivo dell'autofagia contro la citotossicità indotta dal triossido di arsenico e la pirotosi dipendente dai ROS nelle cellule NCTC-1469. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, *217*, 111396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Li, Y.Q.; Zhang, Z.X.; Xu, Y.J.; Ni, W.; Chen, S.X.; Yang, Z.; Ma, D. La N-acetil-L-cisteina e la pirrolidina ditiocarbammato hanno inibito l'attivazione del fattore nucleare-kappaB nei macrofagi alveolari con meccanismi diversi. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 339-346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Shi, Y.; Zeida, A.; Edwards, C.E.; Mallory, M.L.; Sastre, S.; Machado, M.R.; Pickles, R.J.; Fu, L.; Liu, K.; Yang, J.; et al. Sonde chimiche a base di tiolo mostrano attività antivirale contro il SARS-CoV-2 attraverso l'interruzione allosterica del disolfuro nella glicoproteina spike. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2120419119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Calzetta, L.; Matera, M.G.; Rogliani, P.; Cazzola, M. Attività multiforme della N-acetil-l-cisteina nella malattia polmonare cronica ostruttiva. *Expert Rev. Respir. Med.* **2018**, *12*, 693-708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Sanguinetti, C.M. N-acetilcisteina nella BPCO: perché, come e quando? *Multidiscip. Respir. Med.* **2015**, *11*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Almudever, P.; Milara, J.; De Diego, A.; Serrano-Mollar, A.; Xaubet, A.; Perez-Vizcaino, F.; Cogolludo, A.; Cortijo, J. Ruolo della tetraidrobiopterina nel rimodellamento vascolare polmonare associato alla fibrosi polmonare. *Thorax* **2013**, *68*, 938-948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Milara, J.; Armengot, M.; Banuls, P.; Tenor, H.; Beume, R.; Artigues, E.; Cortijo, J. Roflumilast N-ossido, un inibitore della PDE4, migliora la motilità delle ciglia e delle cellule epiteliali bronchiali umane ciliate compromesse dal fumo di sigaretta in vitro. *Br. J. Pharm.* **2012**, *166*, 2243-2262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Milara, J.; Peiro, T.; Serrano, A.; Cortijo, J. La transizione epitelio-mesenchimale è aumentata nei pazienti con BPCO e indotta dal fumo di sigaretta. *Thorax* **2013**, *68*, 410-420. [[CrossRef](#)]
66. Milara, J.; Navarro, A.; Almudever, P.; Lluch, J.; Morcillo, E.J.; Cortijo, J. La resistenza ai glucocorticoidi indotta dallo stress ossidativo è prevenuta dalla duplice inibizione di PDE3/PDE4 nei macrofagi alveolari umani. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *41*, 535-546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Gantner, F.; Kupferschmidt, R.; Schudt, C.; Wendel, A.; Hatzelmann, A. Differenziazione in vitro di monociti umani in macrofagi: Cambiamento del profilo PDE e sua relazione con la soppressione del rilascio del fattore di necrosi tumorale alfa da parte degli inibitori PDE. *Br. J. Pharm.* **1997**, *121*, 221-231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Trayner, I.D.; Rayner, A.P.; Freeman, G.E.; Farzaneh, F. Test quantitativo di differenziazione mieloide in pozzetti multipli utilizzando diclorodifluoresceina diacetato (H2DCF-DA) o diidrorodamina 123 (H2R123). *J. Immunol. Methods* **1995**, *186*, 275-284. [[CrossRef](#)]