



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**YRNA LORENA MATOS DE OLIVEIRA**

**PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTE**  
**COVID-19 APÓS VACINAÇÃO**

**ARACAJU, SE**

**2024**

**YRNA LORENA MATOS DE OLIVEIRA**

**PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTE  
COVID-19 APÓS VACINAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Dra. Tatiana Rodrigues de Moura

**ARACAJU, SE**

**2024**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48p Oliveira, Yrna Lorena Matos de  
Perfil fenotípico e funcional de neutrófilos em paciente COVID-19 após vacinação / Yrna Lorena Matos de Oliveira ; orientadora Tatiana Rodrigues de Moura. – Aracaju, 2024.  
100 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Ciências da saúde. 2. COVID-19. 3. Neutrófilos. 4. Imunidade inata. 5. Vacinação. 6. Proteína TREM-1. I. Moura, Tatiana Rodrigues de, orient. II. Título.

CDU 616-022.6

**YRNA LORENA MATOS DE OLIVEIRA**

**PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTE  
COVID-19 APÓS VACINAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde da Universidade Federal de  
Sergipe como requisito à obtenção do grau de  
Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 29/07/2024

---

**Orientador: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe**

---

**1º Examinador: Prof. Dra. Camilla Natália Oliveira Santos**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe**

---

**2º Examinador: Profa. Dra. Angela Maria da Silva**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe**

---

**3º Examinador: Prof. Priscila Lima dos Santos**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe**

---

**4º Examinador: Profa. Dra. Maria Fernanda Malaman**  
**Departamento de Medicina/ Universidade Tiradentes**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS** e a toda **Espiritualidade**, onde deposito toda minha Fé, agradeço a minha família, por me proporcionar a oportunidade de chegar até este momento da minha vida, pois o que conquistei foi através da sua vontade, me guiando, fortalecendo e encorajando-me nos momentos em que fraquejei.

Aos meus **pais, avós, irmão e esposo**, agradeço pelo seu amor e carinho, por lutarem junto a mim.

À minha **avó Neidinha** (*in memoriam*) a primeira incentivadora para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, ela que tenho como alicerce e exemplo de vida e que amarei para todo a eternidade.

Ao meu amado filho, **Davi Lucca**, obrigada por ser minha luz e por me encorajar a seguir em frente.

Aos meus **amigos**, obrigado pelo apoio e incentivo nos estudos.

A minha orientadora, a Prof<sup>a</sup>. **Dra. Tatiana Rodrigues de Moura**, por toda partilha de conhecimento, auxílio e amizade construída ao longo desses quatro anos e meio. Agradeço toda compreensão e confiança e principalmente a parceria, apoio e orientação durante a execução, discussão dos resultados. Meu muito obrigada.

A colaboração dos Professores **Cristiane Bani, Angela Maria, Priscila Lima, Lucas Magalhães e Waldecy de Lucca** pela orientação nos experimentos.

Ao Prof. **Dr. Silvio Santana Dolabella**, pelo seu ombro amigo seja no mundo acadêmico ou pessoal. Agradeço todo incentivo e parceria.

À **Ayane, Mariana, Lorranny, Monalisa, João, Rauan, Jileno, Cristiane, Bryanne, Audrey, Will, Yvanna** e demais colegas de pesquisa pelo auxílio com a aquisição dos dados de citometria, ensinamentos e oportunidade de trabalho.

Agradeço, em especial, a todos os profissionais da saúde e aos pacientes e familiares que aceitaram participar da pesquisa no período pandêmico em que vivíamos. Agradeço a confiança, a colaboração, compreensão e todo meu sentimento aos familiares daqueles que infelizmente não sobreviveram.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-UFS**, seus **Docentes e Funcionários** pelos valorosos ensinamentos e por todo o empenho, dedicação e pela oportunidade de qualificação profissional.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal e Nível Superior– Brasil (CAPES)** pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, meu muito obrigado.

## RESUMO

**Introdução:** Uma desregulação na resposta imune inata contra o coronavírus SARS-CoV-2 pode contribuir com pior prognóstico na COVID-19. Biomarcadores séricos liberados por neutrófilos como o receptor TREM-1 e IL-6 são associados a gravidade de doenças inflamatórias. Diferentes perfis funcionais de neutrófilos foram descritos com importante papel na defesa antiviral e, também no processo inflamatório desencadeado pelo vírus. Com o avanço da vacinação é importante compreender como os neutrófilos estão contribuindo na patogênese da doença. **Objetivo:** Avaliar o perfil do neutrófilo na COVID-19 após vacinação. **Métodos:** O presente estudo foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro referente a uma metanálise e, o segundo acerca de um estudo experimental. A metanálise foi realizada a fim de avaliar os níveis séricos da forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1) em humanos com pneumonia viral em comparação com controles saudáveis, de acordo com a diretriz do PRISMA, sendo incluídos sete estudos, quatro estudos analisaram pacientes com COVID-19 e três estudos avaliaram outros vírus. O estudo transversal foi realizado com pacientes COVID-19 grave, sendo 17 pacientes não vacinados e 12 vacinados, internados em unidades de terapia intensiva foi avaliado o perfil fenotípico e funcional de neutrófilos e a dosagem de proteínas séricas e citocinas. O fenótipo dos neutrófilos foi determinado por citometria de fluxo usando os seguintes marcadores de superfície: CD11b (adesão celular), CD16 (capacidade fagocítica), CD182 (quimiotaxia), TREM-1 (ativação), HLA-DR (apresentação de antígeno) e CD274 (atividade supressora), juntamente com a dosagem das proteínas séricas, IL-6 e sTREM-1 avaliadas por meio de imunoenaios específicos e, a dosagem de citocinas : GM-CSF; IFN- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-12 p70; IL-13; IL-18; e TNF- $\alpha$  pelo método de LUMINEX. **Resultados:** Na metanálise foi observado níveis aumentados sTREM-1 nos pacientes com COVID-19 comparado com controles saudáveis (SMD 1,53; IC 95% 0,53-2,52). Além disso, foi encontrado níveis mais elevados de sTREM-1 nos pacientes com COVID-19 grave vacinado comparado aos pacientes saudáveis. Não houve diferença significativa entre pacientes com COVID 19, quando comparado graves de não graves. No estudo transversal foi observado que os níveis séricos de IL-6 foi significativamente mais elevados em pacientes com COVID-19 grave não vacinados comparado ao grupo vacinado. Nos pacientes vacinados os neutrófilos expressaram mais marcadores de superfície TREM-1, CD182, HLA-DR, MFI de HLA-DR e PD-L1, bem como um aumento na população CD16<sup>+</sup>CD182<sup>+</sup>TREM-1<sup>+</sup> ( $p=0,0009$ ) e na população HLA-DR<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup> ( $p<0,0001$ ). Correspondente, os pacientes vacinados demonstraram correlações significativas principalmente relacionadas ao número de neutrófilos PD-L1<sup>+</sup> e citocinas inflamatórias, enquanto em pacientes não vacinados, as citocinas inflamatórias foram negativamente correlacionadas com TREM-1 na superfície dos neutrófilos. **Conclusão:** A partir desses dados podemos concluir que a molécula de TREM-1 participa da patogênese da COVID-19 e, que a vacinação favoreceu um estado mais ativado ou um sistema imunológico mais preparado, em termos de regulação, apresentação de antígenos, quimiotaxia, resposta inflamatória e ativação imune frente a infecção pelo SARS-CoV-2.

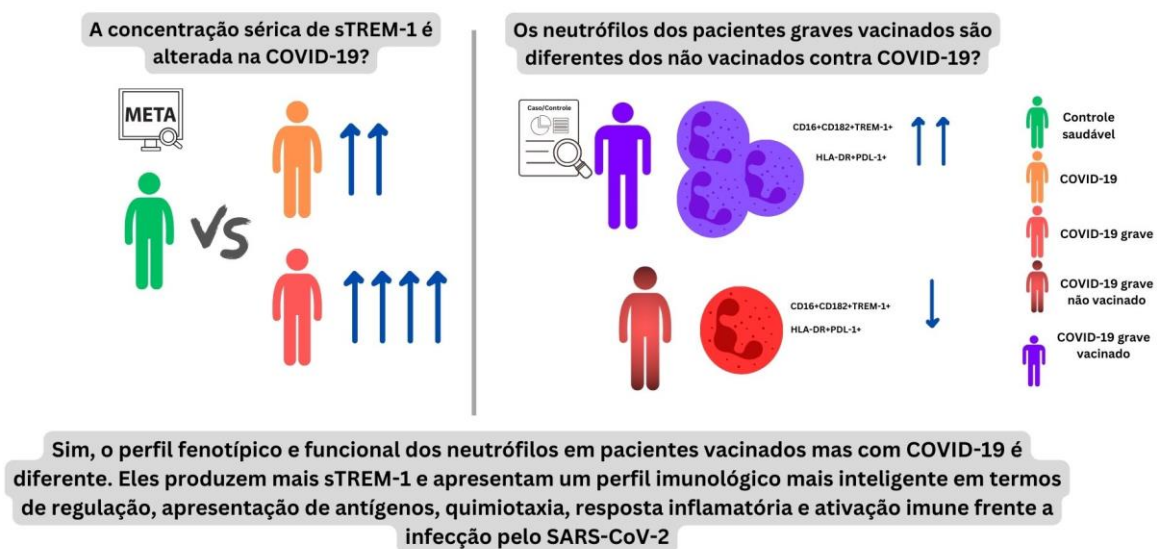
**DESCRIPTORIOS:** Imunidade inata. SARS-CoV-2. Neutrófilos. TREM-1.

## ABSTRACT

**Introduction:** A dysregulation in the innate immune response against the SARS-CoV-2 coronavirus may contribute to a worse prognosis in COVID-19. Serum biomarkers released by neutrophils such as the TREM-1 receptor and IL-6 are associated with the severity of inflammatory diseases. Different functional profiles of neutrophils have been described with an important role in antiviral defense and also in the inflammatory process triggered by the virus. With the advance of vaccination, it is important to understand how neutrophils are contributing to the pathogenesis of the disease. **Aim:** To evaluate the neutrophil profile in COVID-19 after vaccination. **Methods:** This study was divided into two chapters, the first referring to a meta-analysis and the second to an experimental study. The meta-analysis was carried out in order to evaluate serum levels of the soluble form of TREM-1 (sTREM-1) in humans with viral pneumonia compared to healthy controls, according to the PRISMA guideline, and seven studies were included, four studies analyzed patients with COVID-19 and three studies evaluated other viruses. The cross-sectional study was carried out with severe COVID-19 patients, 17 unvaccinated and 12 vaccinated, admitted to intensive care units. The phenotypic and functional profile of neutrophils and the dosage of serum proteins and cytokines were evaluated. The neutrophil phenotype was determined by flow cytometry using the following surface markers: CD11b (cell adhesion), CD16 (phagocytic capacity), CD182 (chemotaxis), TREM-1 (activation), HLA-DR (antigen presentation) and CD274 (suppressive activity), together with the dosage of serum proteins, IL-6 and sTREM-1 assessed using specific immunoassays and, the dosage of cytokines : GM-CSF; IFN- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-12 p70; IL-13; IL-18; and TNF- $\alpha$  by the LUMINEX method. **Results:** The meta-analysis found increased sTREM-1 levels in COVID-19 patients compared to healthy controls (SMD 1.53; 95% CI 0.53-2.52). In addition, higher sTREM-1 levels were found in vaccinated severe COVID-19 patients compared to healthy patients. There was no significant difference between severe and non-severe COVID-19 patients. The cross-sectional study found that serum IL-6 levels were significantly higher in unvaccinated severe COVID-19 patients compared to the vaccinated group. In vaccinated patients, neutrophils expressed more surface markers TREM-1, CD182, HLA-DR, MFI of HLA-DR and PD-L1, as well as an increase in the CD16+CD182+TREM-1+ population ( $p=0.0009$ ) and the HLA-DR+PD-L1+ population ( $p<0.0001$ ). Correspondingly, vaccinated patients showed significant correlations mainly related to the number of PD-L1+ neutrophils and inflammatory cytokines, while in unvaccinated patients, inflammatory cytokines were negatively correlated with TREM-1 on the surface of neutrophils. **Conclusion:** From these data we can conclude that the TREM-1 molecule participates in the pathogenesis of COVID-19 and that vaccination has favored a more activated state or a more prepared immune system, in terms of regulation, antigen presentation, chemotaxis, inflammatory response and immune activation in the face of SARS-CoV-2 infection.

**DESCRIPTORS:** Innate immunity. SARS-CoV-2. Neutrophils. TREM-1.

## RESUMO GRÁFICO



**LISTA DE QUADROS**

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1</b> Anticorpos utilizados nos experimentos da citometria de fluxo. .... | 50 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira e sua replicação. (1) O vírus entra na célula hospedeira através da ligação via receptor ECA-2, com o auxílio da proteína TMPRSS2. Essa ligação ocasiona a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira e à liberação do genoma viral (2). Os estágios (3-7) referem-se as etapas restantes da replicação viral, que englobam a montagem viral, maturação e liberação do vírus. ....22
- Figura 2** Mutações em aminoácidos na região RBD em diferentes cepas de SARS-COV-2..24
- Figura 3** Receptores de maturação de neutrófilos e funções efectoras. ....27
- Figura 4** Representação esquemática dos neutrófilos na COVID-19. A infecção pelo SARS-CoV-2 nos pneumócitos tipo II acarreta no aumento significativo de neutrófilos na circulação periférica em pacientes com COVID-19 grave. Os neutrófilos contribuem na patogenicidade através de eventos pré-trombóticos e síndrome de tempestade de citocinas, bem como o aumento da razão Neutrófilo/Linfócito (NLR) está associada a gravidade e um pior prognóstico na COVID-19. As NETs e os neutrófilos imaturos (LDNs) estão envolvidos na progressão da COVID-19 e na formação de trombose pulmonar.....29
- Figura 5** Fluxograma PRISMA dos estudos selecionados e incluídos. ....38
- Figura 6** Florest plot dos níveis de sTREM-1 entre pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis. ....40
- Figura 7** Gráfico florestal dos níveis de sTREM-1 de acordo com a gravidade do COVID-19. ....41
- Figura 8** Estratégias de seleção das populações de neutrófilos. De cada grupo foi coletado uma mostra de sangue periférico, que ainda, fresco, foi direcionado para as etapas de extração de células imunológicas por citometria de fluxo. Após aquisição das amostras os dados foram encaminhados para o Flow Jo, conforme indicado na figura. Legenda: PMN: células polimorfonucleares; N: número amostral; N-VAC: não vacinados, VAC: vacinados.....51
- Figura 9** Níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. ....56
- Figura 10** Análise da expressão do marcador de superfície CD182 na população de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são

representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando CD182. ....57

**Figura 11** Análise do receptor de superfície expresso em células mielóides tipo 1 (TREM-1) de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e acinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando TREM-1. ....58

**Figura 12** Avaliação da expressão de marcador de imunossupressão, HLA-DR, na população de neutrófilos CD11b+ de pacientes COVID-19 graves vacinados e não vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando HLA-DR). ....59

**Figura 13** Avaliação da expressão do marcador de imunossupressão, PD-L1, na população de neutrófilos CD11b+ de pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência). ....59

**Figura 14** Avaliação da expressão do fenótipo inflamatório na população de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. ....60

**Figura 15** Avaliação da expressão do fenótipo imunorregulador em neutrófilos de pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. ....61

**Figura 16** Análises de correlação dos marcadores imunológicos e laboratoriais dos pacientes COVID-19 grave, utilizando o R Studio. ....62

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Características dos estudos incluídos. ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; FLU, influenza; H1N1, influenza A(H1N1); ILI, doença semelhante a gripe; M, homem; F, fêmea; Mi. leve; Mo, moderado; Se, severo; N, tamanho da amostra; NR, não reportado; \* Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil) ..... 39

**Tabela 2** Caracterização dos pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados. 55

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                                                                                                               | <b>14</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                                                                      | <b>16</b> |
| <b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>                                                                                                                                                                                | <b>16</b> |
| <b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>16</b> |
| <b>3 CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                              | <b>17</b> |
| 3.1 Histórico Da Pandemia Ocasionada Pelo Sars-Cov-2 .....                                                                                                                                                    | 17        |
| 3.2 Epidemiologia da Infecção ocasionada pelo SARS-COV-2.....                                                                                                                                                 | 18        |
| 3.3 Caracterização genômica e estrutural do vírus SARS-CoV-2 da COVID-19 .....                                                                                                                                | 20        |
| 3.4 Resposta imunológica na COVID-19 .....                                                                                                                                                                    | 24        |
| 3.5 Neutrófilos: características gerais .....                                                                                                                                                                 | 26        |
| 3.6 Neutrófilos nas infecções respiratórias e na COVID-19.....                                                                                                                                                | 28        |
| 3.7 TREM-1 e atividade inflamatória na COVID-19 .....                                                                                                                                                         | 31        |
| <b>4 CAPÍTULO II – ESTUDO 1: Papel do receptor expresso em células-mielóides 1<br/>(TREM-1) em COVID-19 e outras pneumonias virais: uma revisão sistemática e meta-<br/>análise de estudos clínicos .....</b> | <b>33</b> |
| 4.1 Introdução .....                                                                                                                                                                                          | 33        |
| 4.2 Casuística e Métodos .....                                                                                                                                                                                | 34        |
| 4.2.1 Estratégia da pesquisa .....                                                                                                                                                                            | 34        |
| 4.2.2 Critérios de elegibilidade .....                                                                                                                                                                        | 35        |
| 4.2.3 Seleção dos estudos e Avaliação dos risco de viés .....                                                                                                                                                 | 35        |
| 4.2.4 Extração de dados.....                                                                                                                                                                                  | 35        |
| 4.2.5 Análise de dados.....                                                                                                                                                                                   | 36        |
| 4.3 Resultados .....                                                                                                                                                                                          | 36        |
| 4.3.1 Seleção dos estudos.....                                                                                                                                                                                | 37        |
| 4.3.2 Características dos estudos.....                                                                                                                                                                        | 37        |
| 4.3.3 Síntese de dados .....                                                                                                                                                                                  | 38        |
| 4.3.4 Infecção por SARS-COV-2 e TREM-1 .....                                                                                                                                                                  | 40        |
| 4.3.5 Outras pneumonias virais .....                                                                                                                                                                          | 41        |
| 4.4 Discussão .....                                                                                                                                                                                           | 42        |
| 4.5 Conclusão.....                                                                                                                                                                                            | 43        |
| <b>5 CAPÍTULO III – Estudo 2: Perfil fenotípico e funcional de neutrófilos e<br/>biomarcadores imunológicos em pacientes COVID-19 após vacinação .....</b>                                                    | <b>45</b> |
| 5.1 Introdução .....                                                                                                                                                                                          | 45        |
| 5.2 Casuística e métodos.....                                                                                                                                                                                 | 46        |

|                                                                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1 Desenho do estudo .....                                                                                                                                                | 46        |
| 5.2.2 Aspectos éticos.....                                                                                                                                                   | 47        |
| 5.2.3 Variáveis clínicas .....                                                                                                                                               | 47        |
| 5.2.4 Coleta de sangue.....                                                                                                                                                  | 48        |
| 5.2.5 Análise das populações de células imunológicas por citometria de fluxo .....                                                                                           | 48        |
| 5.2.6 Análise dos marcadores inflamatórios no soro .....                                                                                                                     | 52        |
| 5.2.7 Dosagem de citocinas no soro .....                                                                                                                                     | 52        |
| 5.2.8 Análises estatísticas.....                                                                                                                                             | 52        |
| 5.3 Resultados .....                                                                                                                                                         | 53        |
| 5.3.1 Dados demográficos, características clínicas e laboratoriais .....                                                                                                     | 53        |
| 5.3.2 Análise dos níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 em pacientes COVID-19 graves não vacinado e vacinados.....                                                                | 55        |
| 5.3.3 Análise dos marcadores de superfície expressos em neutrófilos avaliados através da citometria de fluxo .....                                                           | 56        |
| 5.3.4 Análise do perfil funcional dos neutrófilos por citometria de fluxo .....                                                                                              | 60        |
| 5.3.4 Correlações entre a caracterização celular dos neutrófilos com os marcadores imunológicos e laboratoriais dos pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados ..... | 61        |
| 5.4 Discussão .....                                                                                                                                                          | 62        |
| 5.5 Conclusão.....                                                                                                                                                           | 67        |
| <b>6. CONCLUSÃO GERAL .....</b>                                                                                                                                              | <b>68</b> |
| <b>7. PERSPECTIVAS.....</b>                                                                                                                                                  | <b>68</b> |
| <b>8. ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS AO DOUTORADO .....</b>                                                                                                                 | <b>69</b> |
| <b>9. OUTRAS PUBLICAÇÕES.....</b>                                                                                                                                            | <b>69</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                      | <b>71</b> |
| ANEXO A - Estratégia de busca. ....                                                                                                                                          | 91        |
| ANEXO B – Artigo publicado .....                                                                                                                                             | 94        |
| ANEXO C – Tabela de avaliação do risco de viés.....                                                                                                                          | 95        |
| ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética .....                                                                                                                                 | 96        |
| ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....                                                                                                                    | 97        |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) consiste em um distúrbio respiratório agudo, que apresenta potencial multissistêmico, atingindo além das vias respiratórias inferiores e superiores, outros sistemas como o cardiovascular, neurológico, digestivo e renal (FARIA et al., 2021). Essa doença pode apresentar-se de forma assintomática ou leve, bem como evolui para condições de maior gravidade, em decorrência do quadro de insuficiência respiratória e inflamação excessiva, necessitando de suporte ventilatório e, conseqüentemente tratamento em unidades de terapia intensiva (UTI) (SOOD; BEDI, 2022).

A COVID-19 apresentou dimensões pandêmicas e de emergência pública global, resultando em quase 7 milhões de óbitos em âmbito mundial, ocasionando sobrecarga e preocupando os sistemas e profissionais de saúde. Considerando o período entre janeiro de 2020 a junho de 2024, o Brasil se posicionou como segundo país com maior número de mortes por COVID-19, após os EUA (WHO, 2024). Até a data de 20 de junho de 2024, apresentou mais de 38 milhões de casos confirmados e 712.380 óbitos (DATASUS, 2024). O estado de Sergipe, de junho de 2020 a 20 de junho de 2024, apresentou 367.802 casos confirmados e 6.563 óbitos (DATASUS, 2024), sendo que dados publicados por De Souza Araújo e colaboradores demonstraram que, o estado de Sergipe, mesmo apresentando menor densidade populacional e ter realizado o isolamento social, apresentou alta prevalência (11,6%) da infecção por SARS-CoV-2 (DE SOUZA ARAÚJO et al., 2021).

O sistema imunológico tem um importante papel na defesa antiviral, bem como na eliminação do vírus (DAVITT et al., 2022). No entanto, alguns estudos evidenciam em uma heterogeneidade da resposta imunológica na COVID-19, a qual pode resultar em desregulação desse sistema e, ocasionar danos aos tecidos. Nos casos mais graves, o sistema imunológico dos pacientes infectados atua como um importante fator da patogênese. O contínuo estímulo de células e moléculas do sistema imune, juntamente com a desregulação desses componentes, culminam em um estado inflamatório exacerbado o qual não é capaz de suprimir o processo infeccioso (WOODRUFF et al., 2023; GARDIMAN et al., 2022; HADJADJ et al., 2020).

Dentre os componentes do processo inflamatório, destacam-se os neutrófilos uma vez que já foram descritos como biomarcadores de infecção aguda,

desempenhando importante função na imunidade inata e, seu aumento no hemograma já foi relacionado a resultados adversos em pacientes com COVID-19 (LI et al., 2023; WOODRUFF et al., 2023; HENRY et al., 2020). Alguns estudos já relataram que essas células imune, após a infecção pelo SARS-CoV-2, apresenta abundância e funcionalidade alteradas estando associadas a fisiopatologia da doença COVID-19 grave (WOODRUFF et al., 2023; GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020). Os neutrófilos consistem em uma fonte celular importante de citocinas e podem ser os principais contribuintes para a resposta inflamatória na infecção do SARS-CoV-2 (WOODRUFF et al., 2023; XIE et al., 2020) principalmente com a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) e o receptor expresso em células mielóides 1 (TREM-1) (ZHOU et al., 2020).

O TREM-1 consiste em um receptor imunológico inato envolvido na hiperinflamação ocasionada na COVID-19, uma vez que sua ativação potencializa a secreção de inúmeras citocinas (DE OLIVEIRA et al., 2022; TAMMARO et al., 2017), e está relacionado a redução da capacidade de regulação da inflamação (DE SÁ RESENDE et al., 2021).

Por outro lado, com o avanço da vacinação houve uma redução acentuada no número de casos positivos diagnosticados com COVID-19, mas a alta capacidade de mutação do SARS-CoV-2, principalmente da sua proteína *Spike* (S), tem originado variantes de preocupação (VoC) com alta capacidade de evasão do sistema imunológico, aumentando o risco de reinfecção (GAO; MISTRY et al., 2022; O'TOOLE et al., 2021; RAMBAUT et al., 2020). Estudos recentes têm avaliado o perfil de células da resposta imune na patogênese da COVID-19 em pessoas vacinadas, uma vez que a vacinação altera o perfil de resposta celular e humoral dos indivíduos afim de elaborar uma resposta mais protetora. Nesse contexto, torna-se necessário o entendimento acerca do papel funcional dos neutrófilos na infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2.

Dessa forma, o presente estudo visa avaliar se o TREM-1 na COVID-19 está associado a formas mais graves e compreender acerca da existência das variações fenotípicas (ativação, supressão e inflamação) nos neutrófilos de pacientes com COVID-19 após a administração da primeira dose da vacina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o perfil fenotípico e funcional de neutrófilos dos pacientes COVID-19 graves após a vacinação contra o SARS-CoV-2.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- (1) Realizar uma metanálise avaliando a expressão do TREM-1 e sTREM-1 na COVID-19 e, em outras doenças do trato respiratório inferior;
- (2) Analisar a expressão de marcadores de superfície relacionados à ativação, inflamação e regulação nos neutrófilos entre pacientes com e sem vacinação na COVID-19 grave;
- (3) Comparar a população de neutrófilos com função supressora em pacientes com COVID-19 grave vacinados e não vacinados.
- (4) Correlacionar a expressão de citocinas com marcadores imunológicos e laboratoriais dos pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados.

### 3 CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Histórico Da Pandemia Ocasionada Pelo Sars-Cov-2

Nas últimas duas décadas, os coronavírus (CoVs) foram descritos como o agentes responsáveis por duas pandemias, sendo em 2002 relatado o primeiro caso da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), na província de Guangdong na China (KSIAZEK et al., 2003; ZHONG et al., 2003). Nos anos de 2003 e 2004 (Wang *et al.*, 2005) ocorreram novos casos de SARS, resultantes de transmissão zoonótica, sem detecção de casos em humanos. Entretanto, foram encontrados em morcegos, alguns vírus semelhantes aos SARS-CoV que apresentaram capacidade de infectar células humanas sem prévia adaptação (GE et al., 2013; MENACHERY et al., 2015). Em 2012, foi isolado do escarro de um homem com sintomas de pneumonia aguda, na Arábia Saudita, um novo coronavírus denominado de Coronavirus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome – Coronavirus*) (ZAKI et al., 2012).

Após essas duas pandemias, novos estudos foram realizados a fim de conhecer acerca do risco potencial do ressurgimento do SARS-CoV, devido a possibilidade dos coronavírus sofrerem recombinação genética e originar novos genótipos, bem como estar presente no reservatório animal, morcegos (GE et al., 2013; MENACHERY et al., 2015).

No final de 2019, emergiu um surto de pneumonia grave em Wuhan, província de Hubei na China, de origem desconhecida (HUANG et al., 2020; LI, et al., 2020; ZHU et al., 2020a); sendo, posteriormente denominada de doença infecciosa causada pelo coronavírus 2019, COVID-19 (do inglês “*coronavirus disease 2019*”). Concomitantemente, novos casos e óbitos com quadro sintomatológico semelhante foram notificados em diversos países até que, em meados de janeiro de 2020, medidas de saúde pública rigorosas foram adotadas pela China (LI, et al., 2020; ZHU et al., 2020b). Nesse período, a OMS (Organização Mundial de Saúde) declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), conforme Regulamento Sanitário Internacional (EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM, 2020).

Em janeiro de 2020, autoridades sanitárias da China, relataram acerca da identificação de um novo tipo de coronavírus (2019-nCoV) não encontrado antes em humanos, sugerindo como agente etiológico responsável o  $\beta$ -Coronavírus. No dia 11 de fevereiro de 2020, o agente etiológico responsável obteve sua nomenclatura definitiva (SARS-CoV-2), sendo instituído pela OMS o termo COVID-19 (CORONAVIRIDAE

STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2020).

### 3.2 Epidemiologia da Infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2

Embora o mundo tenha feito esforços para conter a infecção pelo SARS-CoV-2, a OMS declarou, no dia 11 de março de 2020, Estado Pandêmico para a COVID-19 (WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b, 2023b). Em seguida, houve sobrecarga dos sistemas de saúde, ocasionando colapso mundial, em dezembro de 2020, quando a infecção pelo SARS-CoV-2 atingiu 216 territórios dos seis continentes, ocasionando cerca 75 milhões de casos e mais de um milhão e meio de óbitos por COVID-19 (DONG, DU E GARDNER, 2020; ZHU et al., 2020). A Europa, rapidamente, se tornou o epicentro da pandemia (WHO, 2020), seguido dos Estados Unidos e posteriormente países da América Latina, incluindo o Brasil (WHO, 2020).

No Brasil, em 3 de fevereiro de 2020, o Ministério da Saúde declarou Estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (BRASIL, 2020). Sendo, o primeiro caso de infecção por SARS-CoV-2 notificado no dia 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo, em um homem com mais de 60 anos recém-chegado da Itália (Brasil, 2020). Em 17 de março de 2020, foi confirmado o primeiro óbito relacionado a COVID-19 (CANDIDO et al., 2020).

Embora o governo brasileiro tenha adotado medidas de restrição a fim de minimizar a propagação do vírus, incluindo: isolamento social, através do fechamento de universidades, escolas e comércio, bem como a adoção de práticas de saúde individual como, uso de máscara e álcool em gel, durante a quarentena, o número de pessoas infectadas continuou em ascensão (BRASIL, 2020). Essas medidas, foram aos poucos, flexibilizadas em decorrência do impacto gerado na economia (CANDIDO et al., 2020), bem como o deslocamento interestadual contribuiu para o surgimento de novas variantes contagiosas do SARS-CoV-2 (GIOVANETTI et al., 2022; NAVECA et al., 2021; DE SÁ RESENDE, et al., 2021).

O Brasil foi um dos países com maior número de casos durante a pandemia da COVID-19, posicionando-se em segundo lugar, após EUA na análise mundial do número de óbitos a cada 100 casos confirmados (WHO, 2024). Sendo que, em 7 de janeiro de 2021, o mesmo apresentou o maior número de casos novos, 87.843 casos, tornando-se

assim, o segundo epicentro da pandemia por SARS-CoV-2 com um total de 21,2 milhões de casos e um elevado número de óbitos, com 591.000 casos até o final de setembro de 2020 (WHO, 2020). No Brasil foram notificados no período de 3 de janeiro de 2020 a 20 de junho de 2024, 38.815.115 casos confirmados de COVID-19 com 702.258 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 17 de janeiro de 2021, aprovou o uso emergencial de vacinas contra o SARS-CoV-2, sendo iniciada imediatamente a Campanha Nacional de Imunização. A Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e o Instituto Butantan de São Paulo, importaram 6 milhões de doses de vacinas da Astrazeneca e Coronavac em colaboração com a Sinovac Biotech (Oxford/Inglaterra e Pequim, China), sendo que até 21 de outubro de 2022, foram administradas 486.682.379 doses de vacina, com aproximadamente 71,8% da população brasileira vacinada com a primeira dose das vacinas disponíveis. Por outro lado, até 26 de outubro de 2022, um total de 12.830.378.906 doses de vacina foram administradas na população mundial. No Brasil, até o dia 26 de novembro de 2023, 184.663.245 pessoas (87%) foram vacinadas com uma dose da vacina e, 110.565.285 (52%) pessoas com pelo menos uma dose de reforço da vacina contra a COVID-19 (WHO, 2023).

O Brasil, geograficamente, é dividido nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, sendo que a distribuição de casos da COVID-19 variou de acordo com características socioeconômicas de cada região, segundo estudos epidemiológicos (CASTRO et al., 2021; COSTA et al., 2021; ZEISER et al., 2022). A região Nordeste, juntamente com a região Norte, foram as mais afetadas em decorrência das baixas condições per capita que se associaram casos de SRAG (Síndrome Respiratória Aguda Grave) mais grave, enquanto as regiões de maior per capita se destacaram quanto ao maior número de diagnósticos de COVID-19 (DE SOUZA et al., 2020).

O estado de Sergipe, o menor estado brasileiro, localizado na região Nordeste, apresentou significativa taxa de transmissão do vírus (FONSECA et al., 2021; DE SOUZA ARAÚJO et al., 2021), sendo notificados 113.916 casos confirmados e 2.500 óbitos no ano de 2020. Em 2021, em Sergipe, foram registrados 164.622 casos confirmados e 3.557 óbitos. Com a administração das vacinas e a adoção das medidas preventivas, o estado apresentou no ano de 2022, 79.743 casos confirmados e 425 óbitos (<https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/>). Até junho de 2024, o estado apresentou 367.774 casos confirmados de COVID-19 e 6.562 óbitos (acessado em 07 de junho de 2024; disponível em <https://covid.saude.gov.br>). Devido a importância da

vacinação frente ao combate da disseminação da COVID-19, poucos estudos foram realizados a fim de caracterizar as populações de células imunológicas em pacientes infectados com o SARS-CoV-2 vacinados, com o propósito de identificar a atuação dos anticorpos nessas células na defesa imune, juntamente com a atuação na eliminação do vírus.

### 3.3 Caracterização genômica e estrutural do vírus SARS-CoV-2 da COVID-19

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os coronavírus consistem em um grupo de vírus envelopados, pertencentes a ordem *Nidovirales* família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*. Com base em sua sequência de proteínas, essa subfamília é dividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (HARRISON, LIN e WANG, 2020; WU et al., 2020). Os gêneros alfacoronavírus e betacoronavírus são os mais prevalentes em humanos e são responsáveis por desencadear desordens respiratórias (HU et al., 2021).

Dentro do gênero *Betacoronavirus* (HUANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020) os coronavírus que ganharam destaque quanto a transmissibilidade e letalidade foram: o SARS (2002), e o MERS-CoV (2012), sendo que ambos apresentam similaridade genética de 79% e 50%, respectivamente, com o SARS-CoV-2 (LU et al., 2020). Os coronavírus são patógenos zoonóticos que podem ser transmitidos a humanos através do contato direto com gotículas respiratórias, liberadas através de tosse ou espirro e contato da membrana mucosa com diferentes fômites (ROTHAN E BYRAREDDY, 2020).

Os coronavírus do gênero *Betacoronavirus*, são microrganismos intracelulares obrigatórios que utilizam da maquinaria das células para sua replicação e propagação. Estes apresentam RNA de fita simples de polaridade positiva (+ssRNA) (~30kb) com estrutura 5' e cauda 3'-poli-A (WU et al., 2020). Sua replicação ocorre mediante liberação do RNA viral no citoplasma da célula-alvo para, posteriormente, produzir as proteínas não estruturais e estruturais, necessárias para sua sobrevivência (NAQVI et al., 2020). Dentre as proteínas estruturais, tem-se: as proteínas do envelope (E) responsável pela montagem e liberação dos vírions, da membrana (M) responsável pela produção dos vírions, do nucleocapsídeo (N) envolvidas no empacotamento do genoma do RNA e nos vírions desempenham papéis na patogenicidade como um inibidor do interferon (IFN)

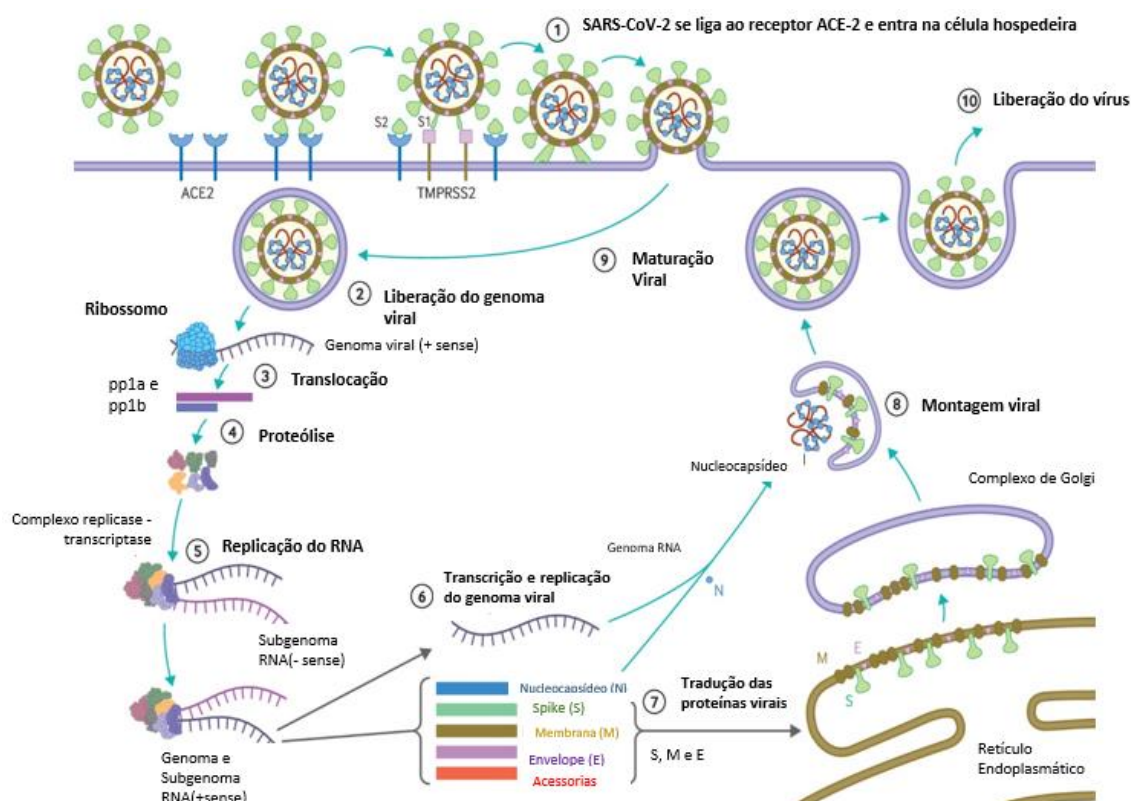
(CUI et al., 2015) e da espícula (S) responsável por reconhecer os receptores das células hospedeiras (KESHEH et al., 2022).

Devido, a intensa ativação imunológica e aos danos que podem acontecer no sistema respiratório, os sintomas característicos das síndromes gripais consistem em: tosse, coriza, expectoração, congestão nasal, mal-estar, febre, dores na garganta, fadiga e desconforto respiratório. No entanto, este vírus ao afetar outros órgãos, ocasiona sintomatologias como diarreia, vômito, perda de olfato e paladar, mialgia, cefaleia, dentre outros. Nesse sentido, a COVID-19 pode ocasionar desde a forma assintomática, resfriados leves à síndrome respiratória aguda grave, falência múltipla de órgãos e, consequentemente óbito (SOOD e BEDI, 2022; ZHOU et al., 2022).

O SARS-CoV e o SARS-CoV-2 utilizam a ECA-2 (enzima convertora de angiotensina tipo 2) para entrar na célula do hospedeiro (FIGURA 1). Esta enzima é expressa abundantemente nos tecidos do organismo humano, principalmente nos tecidos respiratório, cardiovascular, adiposo e renal. Devido a mutações no gene da proteína S, do inglês “*spike*”, especificamente na subunidade 1, onde se localiza o domínio de ligação ao receptor (RBD), o SARS-CoV-2 possui maior afinidade à ECA-2 em comparação ao SARS-CoV. As células epiteliais do sistema respiratório expressam em sua superfície as enzimas ECA-2 e TMPRSS2, sendo que esta via é considerada como o principal acesso do SARS-CoV-2 no tecido respiratório (SOOD e BEDI, 2022; SUNGNAK et al., 2020). No entanto, o SARS-CoV-2 pode utilizar, como via alternativa, a via endossômica através da qual o complexo ECA-2 vírus é translocado para endossomos e a iniciação da proteína S é realizada mediante as proteinases de cisteína endossômica catepsina B e catepsina L. Posteriormente, o vírus é liberado do endossomo no citoplasma dos pneumócitos tipo II e nas células epiteliais brônquicas ciliadas (LETKO, MARZI E MUNSTER, 2020; LI; OU et al., 2020; YUAN et al., 2017).

O SARS-CoV-2 após entrar em contato, via receptor ECA-2, com as células epiteliais do trato respiratório superior, inicia sua replicação e migração para o trato respiratório inferior, atingindo as células do epitélio alveolar. Nestas, o alvo do vírus concentra-se nos pneumócitos tipo II, devido à alta expressão de ECA-2 em sua superfície (VERDECCHIA et al., 2020; ZHANG et al., 2020). No tecido pulmonar, a infecção viral gera o recrutamento de leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos, e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Esses eventos visam eliminar o patógeno, bem como recrutar células do sistema imune adaptativo (JOLY, SIGURET E VEYRADIER, 2020; WIERSINGA et al., 2020; XU et al., 2020).

**Figura 1** Entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira e sua replicação. (1) O vírus entra na célula hospedeira através da ligação via receptor ECA-2, com o auxílio da proteína TMPRSS2. Essa ligação ocasiona a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira e à liberação do genoma viral (2). Os estágios (3-7) referem-se as etapas restantes da replicação viral, que englobam à montagem viral, maturação e liberação do vírus.



Fonte: Adaptado de Cevik et al., 2020

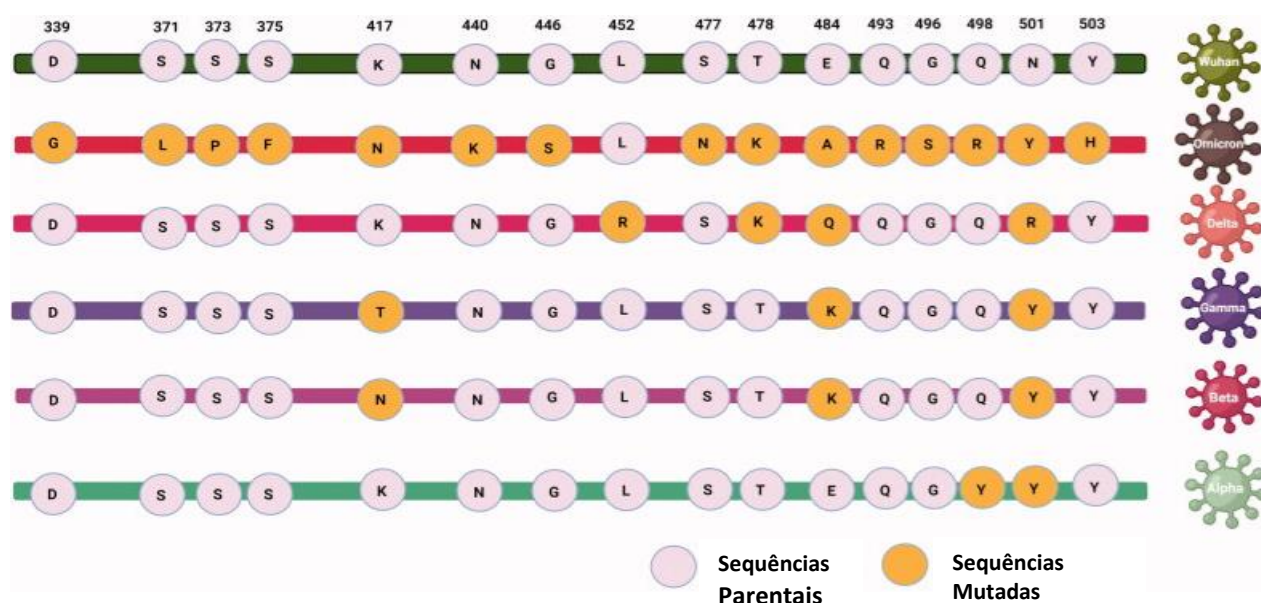
A evolução juntamente com as variações dos vírus, como o SARS-CoV-2, ocorre mediante a mudanças de nucleotídeos no genoma viral durante sua replicação. Esta pode conferir alterações genômicas vantajosas que permitem a uma transmissão viral mais eficaz e evasão do sistema imune, tornando a resposta imune do hospedeiro menos eficaz devido a incapacidade de reconhecer e eliminar o vírus (GÁLAN-HUERTA RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020). As variantes que causam alterações na transmissão, infectividade e gravidade da COVID-19 são denominadas de variantes de preocupação (VoC, do inglês “*variants of concern*”) (WHO, 2023).

As VoCs afetam o risco de reinfecção, juntamente com a potência dos anticorpos neutralizantes desencadeados pela infecção ou vacinação anteriores; sendo assim, é importante o acompanhamento do surgimento dessas variantes através da epidemiologia molecular a qual contribui para a vigilância epidemiológica (GUO; LIU; ZHENG, 2021; NAVECA et al., 2021; TEGALLY; WILKINSON; GIOVANETTI et al., 2021). Dentre

as variantes reconhecidas, cinco se destacam por se enquadrarem como VoCs, sendo elas (FIGURA 2):

- a) Variante  $\alpha$  (B.1.1.7), a qual foi detectada pela primeira vez no final de setembro de 2020 e, se tornou a cepa predominante no Reino Unido, associada a uma maior transmissibilidade e aumento de mortalidade em relação as formas circulantes anteriores (VOLZ et al., 2021);
- b) Variante  $\beta$  (B.1.351), detectada pela primeira vez em outubro de 2020, tornando-se a cepa dominante ocasionando a segunda onda de infecção na África do Sul (TEGALLY et al., 2021);
- c) Variante  $\gamma$  (P.1), detectada em quatro indivíduos brasileiros que viajaram ao Japão em janeiro de 2021 (FUJINO et al., 2021), sendo responsável pelo surgimento de infecções em Manaus (Amazonas, Brasil) (FARIA et al., 2021; NAVECA et al., 2021), estando presente em 80% de todos os vírus sequenciados no Brasil em 1º de março de 2021 (SKELLY et al., 2021);
- d) Variante  $\delta$  (B.1.617.2), detectada em dezembro de 2020, responsável pelo aumento de casos positivos, causando uma segunda onda viral na Índia (CHERIAN et al., 2021; MLCOCHOVA et al., 2021) e infecções em vários locais a nível mundial (BROWN et al., 2021);
- e) Variante O (B.1.1.529), a última variante de preocupação anunciada pela OMS, foi detectada pela primeira vez em novembro de 2021 por laboratórios de vigilância genômica de classe mundial na África do Sul e encontrada em outros países ao redor do mundo (WHO, 2021), sendo considerada a VoC mais transmissível, no entanto apresenta sintomas mais leves e menor letalidade. Essa variante apresenta maior número de mutações no domínio RBD da proteína S quando comparada a cepa de Wuhan (Figura 3) (BRIZZI et al., 2022; FERNANDES et al., 2022).

**Figura 2** Mutações em aminoácidos na região RBD em diferentes cepas de SARS-COV-2



Fonte: Adaptado de Fernandes et al., 2022.

O surgimento dessas variantes torna-se preocupante, uma vez que podem ocasionar alterações na transmissibilidade viral, virulência e quadros de reinfecção por escapar da imunidade natural ou induzida por vacina (MISTRY et al., 2022), uma vez que todas apresentam mutações na proteína Spike (proteína S), que é alvo de grande parte das vacinas ofertadas até o momento (O'TOOLE et al., 2021; RAMBAUT et al., 2020).

### 3.4 Resposta imunológica na COVID-19

O sistema imunológico tem como função reconhecer substâncias e patógenos estranhos ao organismo humano a fim de protegê-lo e preservar a homeostase metabólica (ABBAS, LICHTMAN E PILLAI, 2019; RYU, 2017), uma vez que a resposta imune é crucial para determinar a suscetibilidade e gravidade da doença. A imunidade inata consiste na primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos, incluindo o vírus SARS-CoV-2. Inúmeras células de defesa imunes, abrangendo neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, célula natural killer são ativadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2.

O epitélio pulmonar consiste em uma barreira de proteção do hospedeiro contra a infecção por patógenos invasores. Os alvéolos são revestidos pelo epitélio alveolar formando uma camada de células alveolares tipo I e células alveolares tipo II

(pneumócitos II), sendo que essas células são responsáveis por controlar o fluxo de fluídos, íons e infiltrado de células inflamatórias no espaço intersticial entre os alvéolos e o epitélio pulmonar (AL-KHAWAGA E ABDELALIM, 2020). As células alveolares tipo II expressam em sua superfície o receptor ECA-2, o qual compõe o sistema renina-angiotensina (SRA) responsável pelo aumento das atividades simpática, vasoconstrição, inflamação, liberação de vasopressina e aldosterona. No entanto, além das células alveolares tipo II, os macrófagos alveolares consistem nas principais células-alvo da infecção pelo vírus (HOFFMANN et al., 2020). As células, ao reconhecer o vírus, induzem a ativação de vias de sinalização que ocasionam a liberação de mediadores imunológicos, citocinas e quimiocinas, que favorecem o recrutamento de novas células com fenótipos inflamatórios para os alvéolos infectados, gerando assim uma resposta imunológica exacerbada (STREICHER E JOUVENET, 2019).

A resposta imune inata consiste em uma linha de defesa contra infecções virais desencadeada pela detecção dos vírus mediante a presença dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) reconhecidos através dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) intracelulares, no hospedeiro, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e Interferons), quimiocinas e a morte celular inflamatória (KARKI et al., 2022). Sendo que, a produção de IFN-I (Interferon tipo I) ocorre através do reconhecimento dos ácidos nucleicos virais do SARS-CoV-2 pelas células infectadas (SCHOGGINS, 2019). Estas conseguem externar fragmentos proteicos do vírus em sua superfície através de receptores MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade), favorecendo a ativação do sistema imunológico. A expressão de receptores na superfície celular determina o fenótipo da célula e contribui para a identificação da sua funcionalidade durante a infecção (SANTOS E SILVA et al., 2021).

A produção de citocinas pró-inflamatórias ocorre mediante a estimulação ocasionada pelo vírus nas células epiteliais infectadas e mielóides circulantes (GUO et al., 2020). No entanto, embora as respostas inflamatórias sejam de suma importância para controlar a replicação viral (PARK et al., 2020), o SARS-CoV-2 desenvolveu estratégias para driblar a detecção imune inata, não ativando o reconhecimento através dos PRRs, interferindo assim na resposta dos IFN (Interferons) (VABRET et al., 2020).

Entretanto, casos graves da COVID-19 (Doença do Coronavírus 2019) são descritos por apresentar uma excessiva resposta inflamatória na corrente sanguínea e nos pulmões mediante a liberação de inúmeras citocinas, como IL-6, TNF e INF-  $\gamma$ , desencadeando a morte celular inflamatória e, conseqüentemente resultando em uma tempestade de

citocinas (KARKI et al., 2022; PURBEY et al., 2023b). Esta é caracterizada pela elevação de diversas citocinas séricas, entre elas: interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , quimiocina C-C ligantes (CCL) 2, CCL3, quimiocina C-X-C ligante (CXCL) 10, fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 $\alpha$  (CHUA et al., 2020; LIAO et al., 2020b).

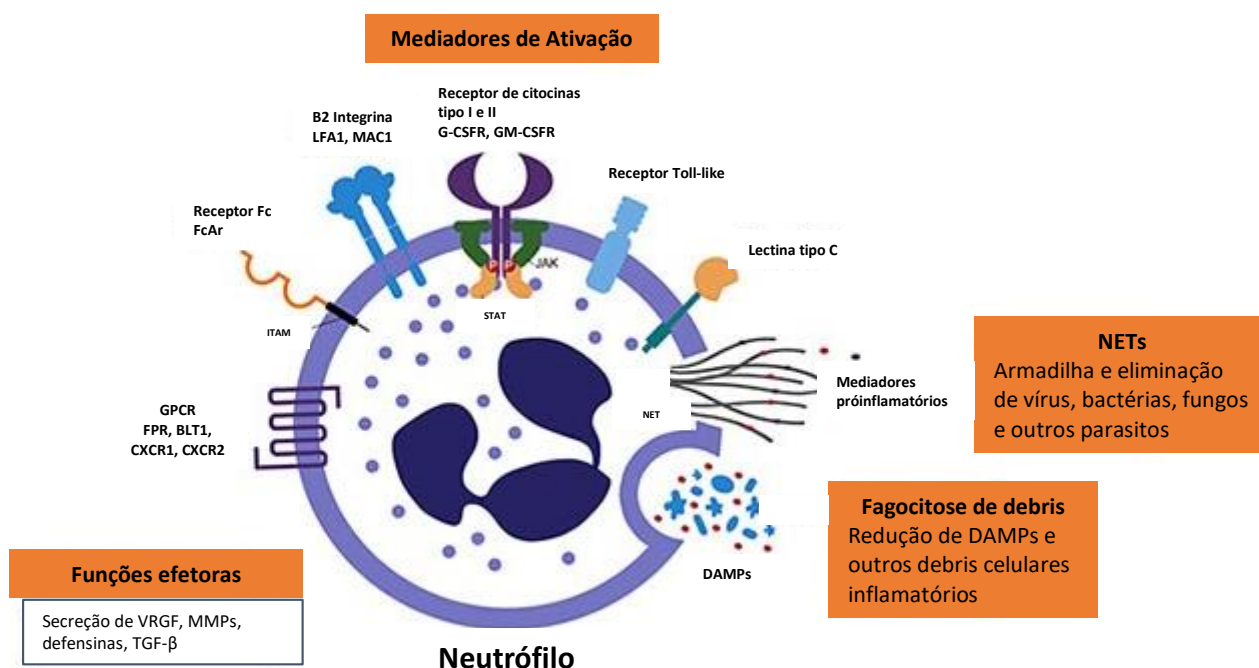
A resposta imune inata precoce é crucial para controlar a infecção viral; no entanto, sua resposta tardia, quando não controlada pode provocar danos teciduais e falência de órgãos (KARKI et al., 2022). Nesse contexto, as células da resposta imunológica podem contribuir para a persistência da hiperinflamação e apresentar um comportamento disfuncional (CHUA et al., 2020; GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020; LEE et al., 2020). Os neutrófilos, importantes células de defesa, contribuem para a hiperinflamação, ocasionada pela infecção viral, mediante a formação de NET e liberação de TREM-1 (receptor do expresso em células mieloides-1) o qual amplifica a produção de citocinas pró-inflamatórias nestas células (COLONNA E FACCHETTI, 2003; DE NOOIJER et al., 2021; DA SILVA-NETO et al., 2021).

### 3.5 Neutrófilos: características gerais

No processo inicial de uma infecção, a resposta imune inata é essencial para a proteção do hospedeiro. Entre as principais células efetoras dessa resposta estão os neutrófilos (FIGURA 3), que são os leucócitos mais abundantes e representam a principal barreira do sistema imune inato contra microrganismos. Diferente dos macrófagos, os neutrófilos apresentam período de vida curto, cerca de 8 a 12 horas na circulação sanguínea (MAYADAS, CULLERE E LOWELL, 2014; SHESHACHALAM et al., 2014).

A formação terminal dos neutrófilos dá-se pela proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea durante a hematopoiese e por meio da estimulação de citocinas, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). A produção desse tipo celular alcança uma taxa de  $10^{11}$  células por dia, podendo chegar a  $10^{12}$  durante um processo infeccioso (MAYADAS, CULLERE E LOWELL, 2014).

**Figura 3** Receptores de maturação de neutrófilos e funções efetoras.



Fonte: Adaptado de ThermoFisher Scientific, 2024

Os receptores de quimiocinas CXCR4 e CXCR2 (CD182) são fundamentais para a manutenção e liberação dos neutrófilos na medula óssea, respectivamente. Visto que esses receptores são expressos em células endoteliais, estromais e osteoclastos, os neutrófilos ficam armazenados na medula até completarem a maturação (AMULIC et al., 2012). Após a maturação, os neutrófilos são liberados da medula e vão para corrente sanguínea. Quando ocorre uma lesão ou infecção, células do hospedeiro e produtos secretados pelo patógeno produzem fatores inflamatórios, os quais desencadeiam uma série de respostas, que vão desde a estimulação da expressão de moléculas de adesão da superfamília das selectinas (tipo E e P) e das integrinas (ICAMs- moléculas de adesão intercelular) pelas células endoteliais proximais, até a sinalização, via IL-17, para o aumento da produção leucocitária (MAYADAS, CULLERE E LOWELL, 2014).

A migração dos neutrófilos dos vasos sanguíneos para o sítio da infecção ocorre através da interação entre selectinas do endotélio e dos neutrófilos ocasionando o rolamento, seguido de uma forte adesão dessas células ao endotélio e transmigração através do endotélio e membrana basal (KENNEDY E DELEO, 2009). No líquido intersticial, os neutrófilos são atraídos pelo gradiente quimiotático para o local da infecção, onde ocorrerá o reconhecimento do patógeno via receptores de membrana do tipo Fc (FcγRIIa/ CD32, FcγRIIb/ CD16 e FcγRIV), capazes de identificar mediadores solúveis oriundos do sistema complemento, e imunoglobulinas (IgG), como também

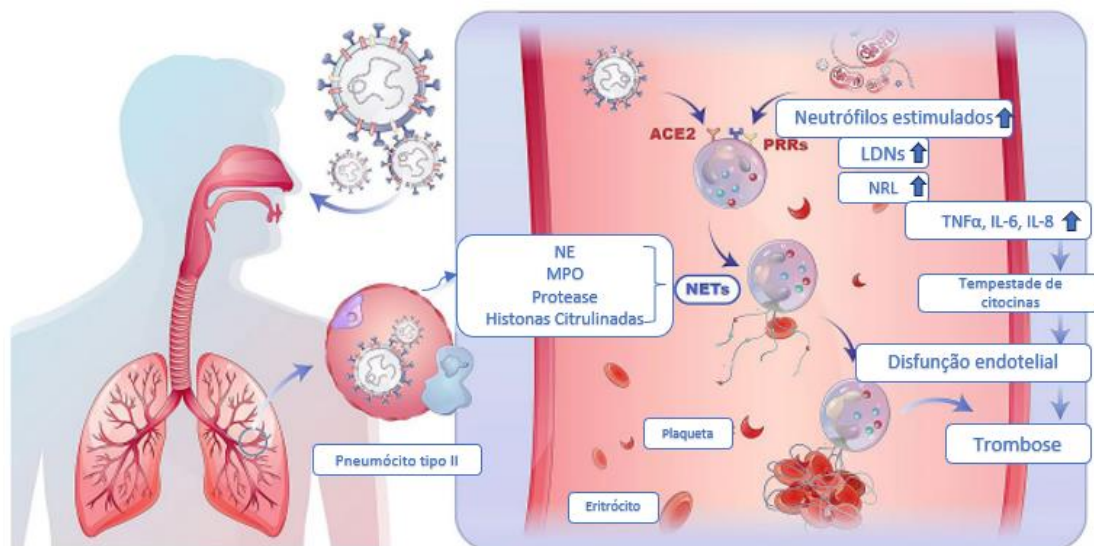
através de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), principalmente os receptores do tipo Toll (TLR), que levará à fagocitose do patógeno e ativação de mecanismos microbicidas dos neutrófilos, como degranulação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas e quimiocinas (LI et al., 2023).

A resposta imunológica rápida dos neutrófilos depende tanto das proteínas granulares pré-formadas com atividade antimicrobiana, como da capacidade de gerar atividade de explosão respiratória (LI et al., 2023; SHESHACHALAM et al., 2014). O reconhecimento viral gera a ativação das cascatas de sinalização, que consequentemente influem na liberação de citocinas e quimiocinas direcionando o recrutamento de células imunes para o local da infecção, dentre elas os neutrófilos. Essas células com base em seu estado de ativação e através de inúmeros mecanismos celulares, estão relacionadas com a eliminação do patógeno (LI et al., 2023; BUONAGURO et al., 2012; EKSIOGLU et al., 2011).

### 3.6 Neutrófilos nas infecções respiratórias e na COVID-19

Os pacientes com COVID-19 grave compartilham características da tempestade de citocinas e dano alveolar com a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Sendo que, a COVID-19 caracteriza-se por uma elevação sistêmica de inúmeras citocinas, que incluem IL (Interleucina) 1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-10, IFN tipo I e II, TNF (Fator de Necrose Tumoral) e as quimiocinas inflamatórias CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CXCL10/IP-10 o que pode ser consequência de uma resposta imune disfuncional, induzindo a tempestade de citocinas (WOODRUFF et al., 2023; GARDIMAN et al., 2022; HAN et al., 2020; MEHTA et al., 2020). Já foi relatado que pacientes com COVID-19 apresentam uma desregulação imune que acarreta em uma hiperinflamação periférica e viral (LI et al., 2023; LAGUNAS-RANGEL, 2020), decorrente de uma hiperativação imunológica, ocasionada por elevados níveis de citocinas e quimiocinas, redução do número de linfócitos (TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup>), e aumento do número de neutrófilos (WOODRUFF et al., 2023; MEHTA et al., 2020) (FIGURA 4).

**Figura 4** Representação esquemática dos neutrófilos na COVID-19. A infecção pelo SARS-CoV-2 nos pneumócitos tipo II acarreta no aumento significativo de neutrófilos na circulação periférica em pacientes com COVID-19 grave. Os neutrófilos contribuem na patogenicidade através de eventos pré-trombóticos e síndrome de tempestade de citocinas, bem como o aumento da razão Neutrófilo/Linfócito (NLR) está associada a gravidade e um pior prognóstico na COVID-19. As NETs e os neutrófilos imaturos (LDNs) estão envolvidos na progressão da COVID-19 e na formação de trombose pulmonar.



Fonte: Adaptado de Li et al., 2023.

A razão neutrófilo/linfócito (NRL) é utilizada como um dos marcadores clínicos de inflamação no monitoramento da COVID-19 (McKENNA et al., 2022; JIMENO et al., 2021). O aumento dessa razão é explicado pela elevação da proporção de neutrófilos (neutrofilia) em detrimento da redução do número de linfócitos (linfopenia) no sangue periférico; constantemente relatada em pacientes com COVID-19 (McKENNA et al., 2022). A inflamação persistente acarreta na exaustão, com aumento da expressão de marcadores de morte programada (PD-1 ou CD279) entre pacientes graves e apoptose nas células T (AGRATI et al., 2020; BOST et al., 2021; DIAO et al., 2020; FATHI E REZAEI, 2020; MATHEW et al., 2020; MAUCOURANT et al., 2020; WILK et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são liberados em decorrência das células infectadas entrarem em piroptose, morte celular não programada associada à infecção por patógenos intracelulares. Consequentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias aumenta, juntamente com o recrutamento de mais células gerando mais danos teciduais (PURBEY et al., 2023; WULANDARI, HARTONO E WIBAWA, 2023; LI et al., 2023). Devido ao excesso de mediadores inflamatórios que provocam danos e

complicações teciduais de difícil controle, a hiperinflamação foi associada à mortalidade na COVID-19 (LI et al., 2023; CHEN et al., 2020; MERAD E MARTIN, 2020; ZHOU et al., 2020b).

Sabe-se que, os neutrófilos que apresentam fenótipo inflamatório contribuem para os danos teciduais, principalmente, através da produção de redes de armadilhas extracelulares ricas em grânulos, as quais são chamadas de NETs. Embora sejam uma potente estratégia de defesa antimicrobiana, a liberação excessiva de NETs leva à morte de neutrófilos e, conseqüentemente a amplificação da inflamação local e sistêmica, ocasionando danos teciduais, estimulando processos trombóticos com ativação de plaquetas e, assim, favorecer a progressão da gravidade da COVID-19 (DOS RAMOS ALMEIDA et al., 2024; AL-KURAISHY et al., 2022; BAUTISTA-BECERRIL et al., 2021; TOMAR et al., 2020). Além desse contexto inflamatório, já foi observado em câncer o perfil imunossupressor de neutrófilos superexpressando PDL-1, o qual evita a detecção de células cancerígenas pelas células T, bem como está associado a fenótipos mais agressivos no câncer (PILLAI et al., 2018).

Para resolução da inflamação via NETs, ocorre morte celular por apoptose, cujo objetivo principal é eliminar os neutrófilos envolvidos na ação antimicrobiana, além de gerar um efeito secundário através da produção de sinais da célula apoptótica. Assim, o recrutamento de neutrófilos para o local de inflamação é interrompido, aumentando o recrutamento de macrófagos, sendo alterado o fenótipo dessas células de um estado pró-inflamatório (M1) para um fenótipo anti-inflamatório (M2) (BOGDAN, RÖLLINGHOFF E DIEFENBACH, 2000; WINTERBOURN E KETTLE, 2013). A apoptose é um processo de morte celular programada e não inflamatório, caracterizado pela perda de grânulos citoplasmáticos, surgimento de projeções exofíticas na superfície da membrana, e condensação da heterocromatina nuclear. A indução desse processo pode ocorrer via diversos mecanismos regulados por sinais vindos do interior celular, caracterizando apoptose espontânea ou constitutiva, ou sinais do exterior da célula, ambos levando à ativação de caspases-3, 8 e 9 (WINTERBOURN E KETTLE, 2013).

Giammarelos-Bourboulis e colaboradores (2020) encontraram que dentro da população de pacientes graves pode existir heterogeneidade na resposta imunológica. Essa heterogeneidade e desregulação imunológica é discutida em outros estudos, ressaltando que os pacientes devem ser tratados de forma personalizada (WOODRUFF

et al., 2023; LI et al., 2023; BHARDWAJ et al., 2022; MATHEW et al., 2020; MERAD et al., 2022; PURBEY et al., 2023; WILK et al., 2020; ZHANG. et al., 2020).

### 3.7 TREM-1 e atividade inflamatória na COVID-19

O sistema imunológico sofre constantes estímulos por agentes inflamatórios infecciosos e não infecciosos. Com isso, inúmeros receptores desempenham importantes funções na modulação da resposta imune; consequentemente, são responsáveis pelo reconhecimento, adesão e ativação celular, dando origem ao processo inflamatório (TAKEUCHI E AKIRA, 2010).

O receptor expresso em células mielóides-1 (TREM-1) constituem uma família de receptores de superfície celular que apresentam potencial modulador da resposta inflamatória devido a sua capacidade de amplificar ou diminuir os sinais induzidos por PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) (GENUA et al., 2014).

O TREM-1 consiste em uma glicoproteína transmembrana de 30kDa, pertencente a superfamília de imunoglobulinas altamente expressa em células mieloides como neutrófilos, monócitos/macrófagos (NGUYEN-LEFEBVRE et al., 2018; CHEN et al., 2008; BOUCHON, DIETRICH E COLONNA, 2000). Sua expressão, TREM-1, não é exclusiva de células mieloides, uma vez que este receptor já foi descrito como presente em células epiteliais brônquicas, parenquimatosas, células endoteliais hepáticas, gástricas e córneas (LIAO et al., 2020a, 2013; RIGO et al., 2012). Os genes que codificam a família de receptores TREM estão localizados no cromossomo 6p21, sendo que quanto a expressão em neutrófilos, observou-se que TREM-1 é especificamente aumentado durante a sepse, enquanto a expressão do TREM-2 não foi detectada neste tipo de célula (GENUA et al., 2014).

O TREM-1, receptor imunológico inato, está presente em duas formas, como receptor ligado à membrana (mTREM-1) e como proteína solúvel (sTREM-1) (KERGET et al., 2021; BOUCHON, DIETRICH E COLONNA, 2000). A ativação do TREM-1 potencializa a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e ao mesmo tempo ativa mecanismos de sobrevivência destas células, o que favorece a manutenção da atividade inflamatória (DE OLIVEIRA et al., 2022; TAMMARO et al., 2017). Em pacientes COVID-19 graves é observado um aumento significativo do sTREM-1, sugerindo redução da capacidade de regulação da inflamação (DE SÁ RESENDE et al., 2021; DE

OLIVEIRA et al., 2022). Sendo que, ambos marcadores foram associados com a gravidade em infecções e sugeridos como marcadores da hiperinflamação na COVID-19.

A forma solúvel do TREM-1 pode originar-se da clivagem proteolítica do mTREM-1 através da ação de metaloproteinases (GÓMEZ-PIÑA et al., 2007) ou da tradução de um splicing alternativo do mRNA do TREM-1 (GINGRAS et al., 2002). Estudos demonstraram que o sTREM-1 regula negativamente a sinalização do mTREM-1 neutralizando seus ligantes (YUAN et al., 2016; DU et al., 2016). O sTREM-1 foi medido em fluidos corporais, incluindo soro, líquido cefalorraquidiano e líquido de lavagem broncoalveolar de pacientes com diversas condições inflamatórias (DE SÁ RESENDE et al., 2021). Verificou-se que níveis aumentados de sTREM-1 estão associados a resultados clínicos desfavoráveis em doenças infecciosas e não infecciosas (DE OLIVEIRA MATOS et al., 2020; BOMFIM et al., 2017; GIBOT, 2005).

As pneumonias virais são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Atualmente, há um surgimento de novos patógenos virais respiratórios, incluindo vírus influenza A, hantavírus, influenza aviária H5N1 e coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) associados à doença coronavírus 2019 (COVID-19) (HODGENS AND GUPTA, 2022). Na prática clínica, uma ampla gama de biomarcadores tem sido utilizada para avaliar a gravidade e a mortalidade da doença. Nos últimos anos, vários estudos sugeriram que o receptor desencadeador expresso em células mielóides-1 (TREM-1) é um importante biomarcador no diagnóstico e prognóstico de doenças respiratórias virais (DE NOOIJER et al., 2021; YE et al., 2014).

Alguns estudos sugeriram que o amplo espectro de sintomas clínicos em doenças virais reflete o aumento da ativação do sistema imunológico, caracterizado por níveis elevados de citocinas inflamatórias (MARTINS-FILHO et al., 2020; YANG et al., 2020). Embora o sTREM-1 seja um biomarcador inflamatório promissor (DE SÁ RESENDE et al., 2021; BELLOS et al., 2018), não há evidências sistemáticas comparando os níveis deste biomarcador entre pacientes com pneumonia viral e controles saudáveis.

## **4 CAPÍTULO II – ESTUDO 1: Papel do receptor expresso em células-mielóides 1 (TREM-1) em COVID-19 e outras pneumonias virais: uma revisão sistemática e metanálise de estudos clínicos**

### **4.1 Introdução**

As pneumonias virais são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. Atualmente, há uma emergência de novos patógenos virais respiratórios, incluindo o vírus influenza A, hantavírus, influenza aviária H5N1 e coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) associados à doença do coronavírus-2019 (COVID-19) (HODGENS E GUPTA, 2022). Na prática clínica, uma ampla gama de biomarcadores tem sido utilizada para avaliar a gravidade e a mortalidade da doença. Nos últimos anos, vários estudos têm sugerido que o Receptor Expresso em Células Mielóides-1 (TREM-1) é um importante biomarcador no diagnóstico e prognóstico de doenças respiratórias virais (YE et al., 2014; DE NOOIJER et al., 2021).

O TREM-1 consiste em um receptor inato do sistema imune expresso em células imunes inatas e está presente em duas formas, como receptor ligado à membrana (mTREM-1) e como proteína solúvel (sTREM-1) (BOUCHON et al., 2000; KERGET et al., 2021). O mTREM-1 possui três domínios em sua estrutura: um que se assemelha à Ig responsável pela ligação ao ligante, um ligado à transmembrana e uma porção citoplasmática que se associa à proteína DAP12 (COLONNA, 2003; TAMMARO et al., 2017). Esse complexo, quando ativado, aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (DE OLIVEIRA MATOS et al., 2020), promove a sobrevivência celular por meio da inativação de fatores pró-apoptóticos (YUAN et al., 2016; TAMMARO et al., 2017), e bloqueia a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (DUBAR et al., 2018).

A forma solúvel do TREM-1 pode originar-se da clivagem proteolítica do mTREM-1 através da ação de metaloproteinases (GÓMEZ-PIÑA et al., 2007) ou da tradução de um splicing alternativo do mRNA do TREM-1 (GINGRAS et al., 2002). Estudos mostraram que o sTREM-1 regula negativamente a sinalização mTREM-1 neutralizando seus ligantes (YUAN et al., 2016; DU et al., 2016). O sTREM-1 foi medido em fluidos corporais, incluindo soro, líquido cefalorraquidiano e lavado broncoalveolar de pacientes com várias condições inflamatórias (DE SÁ RESENDE et al., 2021).

Verificou-se que níveis aumentados de sTREM-1 estão associados a desfechos clínicos ruins em doenças infecciosas e não infecciosas (GIBOT, 2005; BOMFIM et al., 2017; DE OLIVEIRA MATOS et al., 2020).

Alguns estudos têm sugerido que o amplo espectro de sintomas clínicos em doenças virais reflete uma ativação aumentada do sistema imunológico, caracterizada por níveis elevados de citocinas inflamatórias (MARTINS-FILHO et al., 2020; YANG et al., 2020). Embora o sTREM-1 seja um biomarcador inflamatório promissor (BELLOS et al., 2018; DE SÁ RESENDE et al., 2021), não há evidências sistemáticas comparando os níveis desse biomarcador entre pacientes com pneumonia viral e controles saudáveis. Assim, o objetivo desta revisão sistemática e metanálise foi (1) avaliar a expressão de mTREM-1 e sua forma solúvel em pacientes com COVID-19 e outras pneumonias virais comparadas a indivíduos saudáveis; e (2) analisar os níveis desses biomarcadores de acordo com a gravidade da doença.

## 4.2 Casuística e Métodos

A revisão sistemática e de metanálise foi conduzida de acordo com a diretriz Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (MOHER et al., 2010).

### 4.2.1 Estratégia da pesquisa

As buscas foram realizadas no PubMed, Scopus, Embase e Google Scholar e limitaram-se a estudos publicados em versões de texto completo, sem restrição de idioma. As listas de referências de todos os estudos e revisões elegíveis foram digitalizadas para identificar estudos adicionais para inclusão. As principais palavras-chave utilizadas nas estratégias de busca foram as seguintes: 'triggering receptor express on myeloid cell-1', 'soluble triggering receptor express on myeloid cell-1', 'TREM-1', 'sTREM-1', 'respiratory tract infections', 'pneumonia viral', 'COVID-19', 'SARS-CoV-2', 'coronavirus', 'respiratory distress syndrome' e 'severe acute respiratory syndrome'. As estratégias de busca foram adaptadas para cada base de dados (ANEXO A) e foram realizadas em 1º de dezembro de 2021.

#### 4.2.2 Critérios de elegibilidade

Os estudos foram considerados elegíveis se fossem estudos observacionais que fornecessem dados sobre os níveis de TREM-1 em humanos com pneumonia viral [vírus sincicial respiratório, influenza, parainfluenza, adenovírus, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), metapneumovírus, rinovírus, bocavírus e parechovírus] em comparação com controles saudáveis. Foram excluídas coinfeções com bactérias e estudos que não forneceram informações claras sobre os microrganismos envolvidos nas infecções.

Resenhas, cartas, correspondências, editoriais, comentários, opiniões de especialistas, relatos de casos, resumos de conferências e experimentos *in vitro* ou em animais também foram excluídos. Além disso, os autores foram contatados por e-mail ou usando o ResearchGate para dados faltantes em estudos potencialmente elegíveis. O tempo de resposta dos dados solicitados foi de 3 semanas, sendo excluídos aqueles que não responderam.

#### 4.2.3 Seleção dos estudos e Avaliação dos risco de viés

Dois investigadores (Y.L.M.O e A.S.R) examinaram independentemente os resultados da pesquisa com base no título e nos resumos. Os estudos relevantes foram lidos na íntegra e selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade. As divergências foram resolvidas por um terceiro revisor (P. R. M-F.).

A Ferramenta de Avaliação de Qualidade para Coortes Observacionais e Estudos Transversais dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) (<https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/study-quality-assessment-tools>) foi usada para avaliar a qualidade dos estudos incluídos por dois investigadores (Y. L. M. O. e A. S. R.).

#### 4.2.4 Extração de dados

Dois investigadores independentes (Y.L.M.O e A.S.R) extraíram os seguintes dados: nome do autor, ano de publicação, periódico, país, desenho do estudo, informações sobre critérios de elegibilidade, ambiente clínico, grupos, tamanho da amostra, idade,

distribuição por sexo, diagnóstico de pneumonia viral e microrganismos envolvidos, gravidade da doença e valores de TREM-1. Quando os valores do TREM-1 não foram relatados em tabelas ou texto e os autores não puderam ser encontrados, os dados foram extraídos usando o WebPlotDigitizer (Web Plot Digitizer, V.3.11. Texas, USA: Ankit Rohatgi, 2017). Caso as médias e desvios padrão também não fossem informados no artigo, foram utilizados métodos indiretos de extração de estimativas (HOZO et al., 2005; WAN et al., 2014).

#### 4.2.5 Análise de dados

Os resultados da metanálise foram expressos como diferença média padronizada (SMD). Um tamanho de efeito de 0,2 foi considerado um efeito pequeno, um valor de 0,5 um efeito médio e um valor de 0,8 um efeito grande (COLEN et al., 2018). Usamos um modelo de efeitos fixos ou aleatórios para agrupar os resultados de estudos individuais, dependendo da presença de heterogeneidade. A heterogeneidade estatística foi quantificada pelo índice  $I^2$  utilizando a seguinte interpretação: 0%, sem heterogeneidade entre estudos; < 50%, baixa heterogeneidade; 50–75%, heterogeneidade moderada; > 75%, alta heterogeneidade (HIGGINS E THOMPSON, 2002). No caso de heterogeneidade, utilizou-se o modelo de efeitos aleatórios, caso contrário, foi utilizado o modelo de efeitos fixos.

Uma análise de subgrupo foi realizada de acordo com a gravidade da doença. Embora os gráficos de funil possam ser ferramentas úteis na investigação de pequenos efeitos de estudos em metanálises, eles têm poder limitado para detectar tais efeitos quando há poucos estudos (SIMMONDS, 2015). Portanto, por termos um pequeno número de estudos incluídos, não realizamos análise de funnel plot. Forest plots foram utilizados para apresentar os tamanhos dos efeitos e intervalo de confiança (IC) de 95%, e  $p < 0,05$  foi utilizado para determinar a significância. As análises foram realizadas utilizando o Review Manager, versão 5.3 (Cochrane IMS).

#### 4.3 Resultados

A seguir, é apresentado os resultados publicados no artigo científico intitulado “Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in COVID-19 and

Other viral pneumonias: A systematic review and meta-analysis of clinical studies”, publicado na revista científica *Inflammopharmacology* (fator de impacto 5.8), doi: 10.1007/s10787-022-00972-6 (ANEXO B).

#### 4.3.1 Seleção dos estudos

A estratégia de busca recuperou 285 registros e 72 duplicatas foram excluídas. Dois registros adicionais foram identificados na literatura cinzenta. Após a triagem de títulos e resumos, 54 artigos com texto completo foram avaliados quanto à elegibilidade e sete estudos (ROHDE et al., 2012; ARRIAGA-PIZANO et al., 2015; ZHONG E ZHAO, 2016; YAŞAR et al., 2021; DE NOOIJER et al., 2021; YOUNGS et al., 2021; KERGET et al., 2021) foram finalmente incluídos nesta revisão sistemática (FIGURA 5)

#### 4.3.2 Características dos estudos

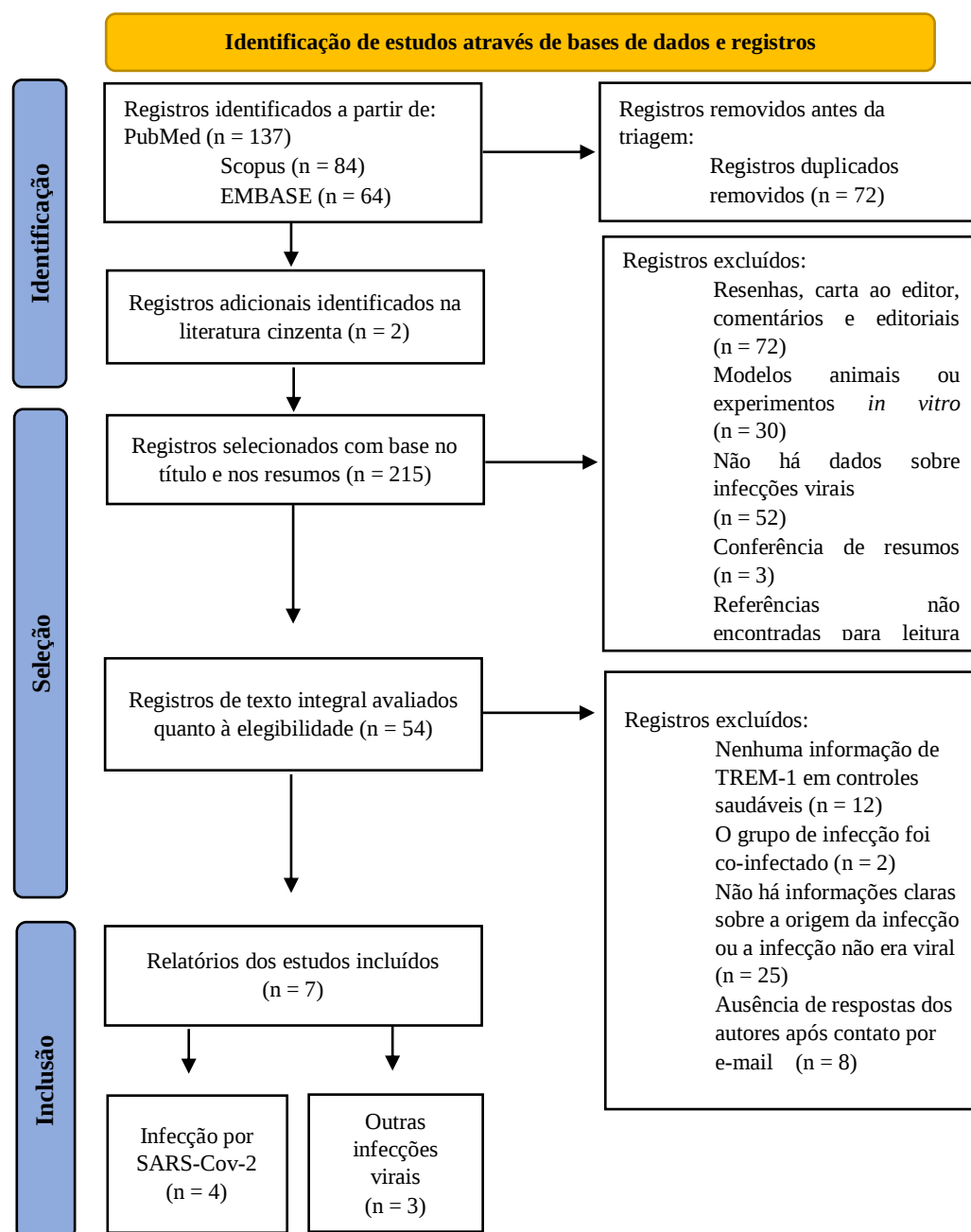
Os estudos incluídos foram publicados de 2012 a 2021 e as principais características estão listadas na Tabela 1. Três estudos foram realizados na Europa (ROHDE et al. 2012; DE NOOIJER et al., 2021; YOUNGS et al., 2021) dois estudos na Turquia (YAŞAR et al., 2021; KERGET et al., 2021) um estudo na Ásia (ZHONG E ZHAO 2016), e um estudo na América Latina (ARRIAGA-PIZANO et al., 2015). Apenas um estudo foi realizado incluindo a população pediátrica ZHONG E ZHAO, 2016).

Quatro estudos incluíram pacientes com COVID-19 (YAŞAR et al., 2021; DE NOOIJER et al., 2021; YOUNGS et al., 2021; KERGET et al., 2021) e três estudos analisaram pacientes com diferentes vírus (ROHDE et al., 2012; ARRIAGA-PIZANO et al., 2015; ZHONG E ZHAO 2016). Todos os estudos relataram que as infecções virais foram confirmadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Todos os estudos apresentaram um grupo controle saudável composto por indivíduos com distribuição semelhante de idade e sexo.

### 4.3.3 Síntese de dados

Devido ao pequeno número de estudos e à heterogeneidade clínica na população estudada, a metanálise foi realizada apenas com pacientes com COVID-19. Todos os estudos que incluíram pacientes com COVID-19 forneceram dados sobre a gravidade da doença. Os resultados de estudos que incluíram pacientes com outras pneumonias virais foram relatados de forma descritiva.

**Figura 5** Fluxograma PRISMA dos estudos selecionados e incluídos.



**Tabela 1** Características dos estudos incluídos. ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; FLU, influenza; H1N1, influenza A(H1N1); ILI, doença semelhante a gripe; M, homem; F, fêmea; Mi. leve; Mo, moderado; Se, severo; N, tamanho da amostra; NR, não reportado; \* Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil)

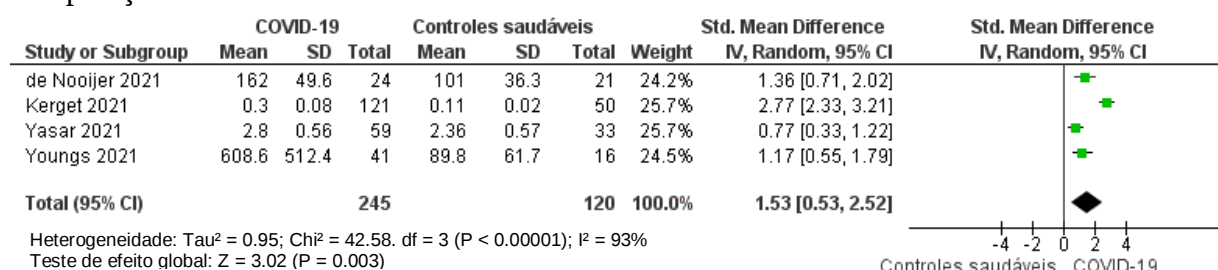
| Autor e Ano                | País        | Design do estudo | Pneumonia Viral            |                       |                      |            |                  |                       |                      |                     | Grupo Controle             |            |                  |                     |                      |                     |
|----------------------------|-------------|------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|------------|------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
|                            |             |                  | Principais Características |                       |                      |            |                  | Dados TREM-1          |                      |                     | Principais Características |            |                  | Dados TREM-1        |                      |                     |
|                            |             |                  | N                          | Vírus                 | Severidade da doença | Gênero     | Idade (y)        | Média (SD)            | Amostra              | Método de Ensaio    | N                          | Gênero     | Idade (y)        | Média (SD)          | Amostra              | Método de Ensaio    |
| Arriaga-Pizano et al. 2015 | México      | Transversal      | 9                          | H1N1 1ª onda          | Mo e                 | 5M<br>4F   | 41 (15 – 49) *   | 7,150.99 (2,678.06)   | Monócitos sanguíneos | Citometria de Fluxo | 12                         | 5M<br>7F   | 30.8 (22 – 64) * | 683.76 (313.39)     | Monócitos sanguíneos | Citometria de Fluxo |
|                            |             |                  | 23                         | H1N1 2ª onda          | Se                   | 13M<br>10F | 48 (18 – 76) *   | 2,792.02 (455.84)     |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
|                            |             |                  | 10                         | ILI 1ª onda           |                      | 6M<br>4F   | 38.2 (15 – 78) * | 2,165 (398.86)        |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
|                            |             |                  | 20                         | ILI 2ª onda           |                      | 8M<br>12F  | 30.3 (16 – 59) * | 2,792.02 (284.9)      |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
| De Nooijer et al. 2021     | França      | Transversal      | 24                         | SARS-CoV-2            | Se                   | 18M<br>6F  | 63 (58 - 71) *   | 162 (49.6) pg/ml      | Soro                 | ELISA               | 21                         | 9M<br>12F  | 42 (22 – 48.5) * | 101 (36.3) pg/ml    | Soro                 | ELISA               |
| Kerget et al. 2021         | Turquia     | Transversal      | Mo: 68                     | SARS-CoV-2            | Mo e                 | 73M<br>48F | 55 (14.3)        | Mo: 0.24 (0.08) ng/ml | Soro                 | ELISA               | 50                         | N/R        | 53.4 (16.1)      | 0.11 (0.02) ng/ml   | Soro                 | ELISA               |
|                            |             |                  | S: 53                      |                       | Se                   |            |                  | Se: 0.29 (0.07) ng/ml |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
| Rhode et al. 2012          | Alemanha    | Transversal      | 118                        | RSV, FLU & Rhinovirus | Mo e Se              | 95M<br>23F | 66 (13)          | 87.5 (97.3) pg/ml     | Soro                 | ELISA               | 13                         | 7M<br>6F   | 47.5 (4)         | 0 (0) pg/ml         | Soro                 | ELISA               |
| Yasar et al. 2021          | Turquia     | Transversal      | Mi: 26                     | SARS-CoV-2            | Mi                   | 13M<br>13F | 51.3 (13.5)      | 2.33 (0.51)           | Soro                 | Método Automático   | 33                         | 17M<br>16F | 61.1 (18.2)      | 2.36 (0.57)         | Soro                 | Método Automático   |
|                            |             |                  | M: 9                       |                       | Mo                   | 3M<br>6F   | 64.8 (12.8)      | 3.11 (0.49)           |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
|                            |             |                  | S: 25                      |                       | Se                   | 2M<br>23F  | 60.6 (11.3)      | 3.20 (0.67)           |                      |                     |                            |            |                  |                     |                      |                     |
| Youngs et al. 2021         | Reino Unido | Transversal      | 41                         | SARS-CoV-2            | Se                   | 26M<br>15F | 57.7 (11)        | 608.57 (512.35) pg/ml | Soro                 | Luminex             | 16                         | 6M<br>10F  | 47.4 (17.8)      | 89.76 (61.66) pg/ml | Soro                 | Luminex             |
| Zhong et al. 2016          | China       | Transversal      | 17                         | NR                    | Se                   | 36M<br>24F | 6 (2.3)          | 1,278 (111) pg/ml     | Soro                 | ELISA               | 30                         | 17M<br>13F | 6.3 (2.2)        | 1,247 (120) pg/ml   | Soro                 | ELISA               |

#### 4.3.4 Infecção por SARS-COV-2 e TREM-1

Esta metanálise incluiu 366 indivíduos, 246 indivíduos com COVID-19 e 120 controles saudáveis. Entre os pacientes com COVID-19, 135 eram homens e 111 eram mulheres, com idade média entre 51 e 65 anos. Entre os pacientes infectados, 103 foram diagnosticados com COVID-19 leve a moderada e 143 com COVID-19 grave. Todos os quatro estudos mediram a forma solúvel de TREM-1 no soro (YAŞAR et al., 2021; DE NOOIJER et al., 2021; YOUNGS et al., 2021; KERGET et al., 2021).

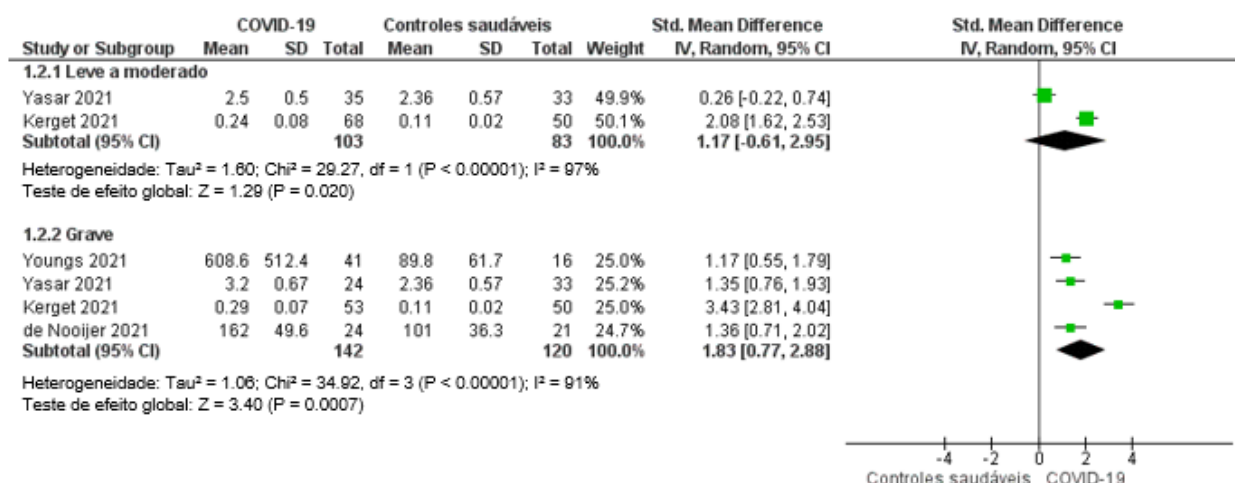
Os resultados gerais da metanálise mostraram níveis aumentados de sTREM-1 entre pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis (SMD 1.53; 95% CI 0.53 para 2.52;  $p < 0.01$ ;  $I^2 = 93\%$ ) e o tamanho do efeito foi considerado muito grande (Figura 6). Na análise de subgrupo que avaliou a expressão de sTREM-1 de acordo com a gravidade da doença, não foram encontradas diferenças entre pacientes com COVID-19 leve a moderada e controles saudáveis (SMD 1.17; 95% CI -0.61 para 2.95;  $p = 0.20$ ;  $I^2 = 97\%$ ), mas níveis mais elevados de sTREM-1 foram demonstrados entre pacientes com COVID-19 grave (SMD 1.83; 95% CI 0.77 para 2.88;  $p < 0.01$ ;  $I^2 = 91\%$ ) (Figura 7).

**Figura 6** Florest plot dos níveis de sTREM-1 entre pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis.



Legenda: Study or Subgroup = Estudo ou Subgrupo; Mean = Média; SD = Desvio Padrão; Weight = Peso; Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI = Diferença Média Padrão IV, Aleatória, 95% CI

**Figura 7** Gráfico florestal dos níveis de sTREM-1 de acordo com a gravidade do COVID-19.



Legenda: Study or Subgroup = Estudo ou Subgrupo; Mean = Média; SD = Desvio Padrão; Weight = Peso; Std. Mean Difference IV, Random, 95% CI = Diferença Média Padrão IV, Aleatória, 95% CI

A Tabela 2 (ANEXO C) mostra a ferramenta de avaliação da qualidade que resultou em risco de viés moderado a alto. Embora as questões de pesquisa e as medidas de resultados tenham sido claramente definidas em todos os estudos, questões importantes sobre o desenho do estudo não foram claramente descritas, tais como medidas de exposição do grupo de controle, justificativa do tamanho da amostra, cegamento dos avaliadores de resultados e ajuste para fatores de confusão.

#### 4.3.5 Outras pneumonias virais

Três estudos investigaram diferenças nos níveis de TREM-1 entre pacientes com outras pneumonias virais e indivíduos saudáveis. Apenas um estudo avaliou a expressão do TREM-1 em monócitos (ARRIAGA-PIZANO et al., 2015), enquanto dois estudos analisaram a forma solúvel do TREM-1 (ROHDE et al., 2012; ZHONG E ZHAO, 2016). Zhong e Zhao (2016) incluíram crianças na população do estudo e Rohde et al. (2012) concentraram-se em adultos com hábitos tabágicos. Todos os três estudos mostraram que os níveis de TREM-1 foram significativamente elevados em pacientes infectados em comparação com os controles.

#### 4.4 Discussão

As infecções respiratórias virais constituem um fardo para o sistema de saúde pública devido à sua rápida transmissibilidade entre as pessoas e à fraca capacidade de controle e recuperação. Desde o surto da infecção por SARS-CoV-2 em dezembro de 2019, há urgência na identificação de biomarcadores de gravidade para melhorar o diagnóstico e prever a evolução clínica dos pacientes (DE NOOIJER et al., 2021; KERGET et al., 2021). Neste contexto, revisões sistemáticas têm demonstrado consistentemente uma associação entre níveis elevados de sTREM-1 e piores resultados clínicos em pacientes com doenças infecciosas. No entanto, estes estudos resumiram as evidências disponíveis baseadas em infecções causadas por diferentes microrganismos, o que limita a compreensão do papel do TREM-1 em infecções específicas (JIYONG et al., 2009; YE et al., 2014; SU et al., 2016). Assim, até onde sabemos, esta é a primeira metanálise realizada para avaliar os níveis de TREM-1 em infecções virais do trato respiratório inferior, especialmente em pacientes com COVID-19.

O diagnóstico nos estágios iniciais da infecção pode ser desafiador devido à falta de especificidade das características clínicas e à eficácia limitada dos marcadores inflamatórios convencionais, como a proteína C reativa (PCR) (ANSAR E GHOSH, 2016). Nas infecções virais, incluindo a COVID-19, o paciente pode evoluir para um quadro crítico denominado tempestade de citocinas, que se caracteriza por uma elevação significativa de marcadores inflamatórios que pode levar à hiperinflamação e falência de múltiplos órgãos (TANG et al., 2020; LUO et al., 2021). A este respeito, o TREM-1 é ativado precocemente na superfície das células mieloides, incluindo neutrófilos e monócitos, para desencadear prontamente a resposta imune inata. Estas células, por sua vez, libertam várias citocinas e proteínas inflamatórias para prevenir a propagação do vírus, melhorar a sua eliminação e recrutar mais células imunológicas. No entanto, falhas nos mecanismos de supressão do TREM-1 podem contribuir para a tempestade de citocinas.

Como mecanismo de feedback, o TREM-1 ligado à superfície é clivado na sua forma solúvel sTREM-1, que supostamente atua como um regulador do estado inflamatório. O TREM-1 solúvel se origina através da proteólise por metaloproteinases ou *splicing* alternativo (GAO et al., 2019) após estimulação do TREM-1 por moléculas inflamatórias (VAN SINGER et al., 2021). Níveis elevados de sTREM-1, principalmente

como resultado da ativação de neutrófilos, correlacionam-se com outros mediadores inflamatórios, como IL-6 e TNF- $\alpha$ , e indicam a ocorrência de dano celular associado ao processo inflamatório e à liberação de proteinases pelas células necróticas ou patógenos (DUBAR et al., 2018). Em nossa metanálise, encontramos aumento de sTREM-1 em pacientes infectados em comparação com indivíduos saudáveis, demonstrando o envolvimento deste biomarcador inflamatório na COVID-19. Na análise de subgrupo, encontramos evidências de que pacientes com COVID-19 grave apresentam níveis mais elevados de sTREM-1 do que pacientes com doença leve ou moderada. Além disso, resultados individuais mostraram níveis elevados de TREM-1 em outras infecções virais do trato respiratório. Estes resultados indicam que o TREM-1 pode ser útil na previsão de resultados clínicos em pacientes com pneumonia viral.

Alguns estudos investigaram se o TREM-1 pode ser um biomarcador sensível e específico de infecções gerais para prever a mortalidade (SU et al., 2016; JEDYNAK et al., 2018; WRIGHT et al., 2020). Considerando as infecções respiratórias, uma metanálise de Su et al. (2016) demonstraram uma sensibilidade de 0.75 (95% CI 0.61 para 0.86) e especificidade de 0.66 (95% CI 0.54 para 0.75) sugerindo um valor prognóstico moderado de sTREM-1 para prever mortalidade. No entanto, a heterogeneidade entre os estudos foi elevada, principalmente devido à variabilidade no tipo de infecções, incluindo casos de sepse. Embora não tenha sido possível medir a sensibilidade e especificidade do sTREM-1 na presente metanálise, nosso estudo mostrou o comportamento do sTREM-1 em pneumonias virais, incluindo COVID-19. Apesar destes resultados, mais estudos são necessários para confirmar o valor prognóstico e o significado clínico do TREM-1 em infecções virais.

#### 4.5 Conclusão

Embora não tenha sido possível medir a sensibilidade e a especificidade do sTREM-1 na presente metanálise, nosso estudo mostrou o comportamento do sTREM-1 em pneumonias virais, incluindo COVID-19. Apesar desses achados, mais estudos são necessários para confirmar o valor prognóstico e o significado clínico do TREM-1 em infecções virais.

Nosso estudo tem algumas limitações importantes: (1) número relativamente pequeno de estudos que avaliaram a função do TREM-1 em infecções virais respiratórias;

(2) diferentes métodos de detecção do TREM-1; e (3) dificuldade em resumir os níveis de TREM-1 em pacientes com outras infecções virais devido à heterogeneidade entre os estudos. Embora estas limitações, este é o primeiro estudo a sintetizar a evidência disponível sobre os níveis de TREM-1 em pacientes com COVID-19 e outras pneumonias virais. Esses achados podem fornecer evidências sobre o papel pró-inflamatório do TREM-1 nessas infecções, contribuindo para o perfil inflamatório e a progressão da doença.

## **5 CAPÍTULO III – Estudo 2: Perfil fenotípico e funcional de neutrófilos e biomarcadores imunológicos em pacientes COVID-19 após vacinação**

### **5.1 Introdução**

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), ocasionada pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) resultou em uma pandemia com alto índice de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No entanto, desde a introdução da vacinação, em meados de dezembro de 2020, estes altos índices foram reduzidos (WATSON et al., 2022). Embora, grande parte dos pacientes apresentem a doença de forma assintomática a leve, outros manifestam a forma grave da doença em decorrência do desconforto respiratório e resposta imune desproporcional que podem ocasionar altos níveis de citocinas circulantes e inflamação excessiva (WOODRUFF et al., 2023; DAVITT et al., 2022; SOOD; BEDI, 2022; XU et al., 2020).

O sistema imunológico inato tem a função de reconhecer o vírus e ativar vias inflamatórias, a fim de elaborar uma resposta antiviral eficaz para a eliminação do vírus (SCHULTZE; ASCHENBRENNER, 2021). No entanto, alguns estudos mostraram uma heterogeneidade na resposta imunológica na COVID-19 grave, a qual pode resultar em uma desregulação desse sistema e, ocasionar danos aos tecidos, sendo que os neutrófilos podem exibir fenótipos hiperinflamatórios e/ou imunossupressores (PURBEY et al., 2023; DAVITT et al., 2022; HADJADJ et al., 2020; GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020).

Evidências clínicas já demonstraram que um maior número de neutrófilos periféricos e uma elevada proporção de neutrófilos para linfócitos (NRL) estão relacionados a resultados mais graves em pacientes com COVID-19, indicando assim o papel imunopatológico dessas células imunes inata durante a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2 (ZHOU et al., 2020; LIU et al., 2020). Embora seja um tipo abundante de células imunológicas, os neutrófilos são reconhecidos por seu papel na defesa antimicrobiana. Entretanto, sua disfunção está relacionada a diferentes respostas inflamatórias durante a patogênese da infecção (CUI et al., 2021).

Com o surgimento de variantes de preocupação (VoCs) do SARS-CoV-2 que são capazes de driblar o sistema imune e, consequentemente a resposta imunológica induzida pela vacina, é de suma importância o conhecimento acerca dos diferentes perfis de

resposta dos neutrófilos em pacientes vacinados que desenvolvem a COVID-19 grave e necessitam de hospitalização (GUO; LIU; ZHENG, 2021; NAVECA et al., 2021).

A resposta imunológica pode ser alterada devido ao histórico de saúde do paciente (DAVITT et al., 2022) bem como, com os diversos desfechos oriundos da infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2 (GREWAL; BUECHLER, 2023). Com isso, a detecção de biomarcadores e alterações imunológicas relacionadas à gravidade da COVID-19 vem sendo estudadas. Dentre os diversos marcadores imunológicos avaliados, o receptor expresso preferencialmente na superfície de neutrófilos, TREM-1, vem sendo avaliado devido a sua contribuição na hiperinflamação na COVID-19 e em outras doenças inflamatórias crônicas (DE OLIVEIRA et al., 2022; DE SÁ RESENDE et al., 2021).

Esse estudo tem como objetivo avaliar o perfil fenotípico e funcional dos neutrófilos frente a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2 após a vacinação, juntamente com a análise de biomarcadores imunológicos que podem estar associados à progressão da doença. Nossa hipótese é que os pacientes COVID-19 grave vacinados apresentem uma população de neutrófilos que contribuam para o comprometimento da resposta imunológica frente a infecção pelos SARS-CoV-2 em comparação aos não vacinados.

## 5.2 Casuística e métodos

### 5.2.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal com análise do fenótipo de neutrófilos obtidos de pacientes hospitalizados com ou sem vacinação em estado grave por COVID-19.

Foram incluídos pacientes acima de 20 anos de idade diagnosticados com pneumonia associada à COVID-19, confirmada por um RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2. Além disso, os pacientes estavam em tratamento em UTI requerendo suporte de oxigênio invasivo e fazendo uso de corticoterapia. O estado grave foi confirmado de acordo com a orientação técnica da OMS para a COVID-19 (<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330854>). Estes pacientes foram recrutados em dois hospitais públicos de referência localizados em Aracaju (Sergipe), Brasil, sendo que os pacientes não vacinados foram recrutados entre 08 de setembro de 2020 a 10 de dezembro de 2020, enquanto os vacinados foram recrutados no período de 06 de setembro de 2021 a janeiro de 2022.

Os critérios de exclusão foram: portadores de qualquer tipo de câncer ou doença autoimune, gestantes e indivíduos que apresentaram problemas durante os experimentos de citometria de fluxo, como baixa obtenção de células, erros na leitura e problemas na marcação com os anticorpos.

### 5.2.2 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética local da Universidade Federal de Sergipe (CAAE 34240620.7.0000.5546 e número de acesso 4.168.255) (ANEXO D). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO E), documento em que consta a proposta, objetivos, procedimentos, riscos e relevância do projeto, foi aplicado diretamente com os pacientes ou com seus tutores legais. Os procedimentos deste projeto foram conduzidos de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, as recomendações da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) do Brasil e as recomendações de Boas Práticas Clínicas estabelecidas pela Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (do inglês “International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use”, disponível em <https://ichgcp.net/>).

### 5.2.3 Variáveis clínicas

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes hospitalizados na mesma data da coleta de sangue. As variáveis coletadas foram: idade, sexo, comorbidades, valores absolutos do leucograma (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), hemograma (hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas), marcadores renais (ureia e creatinina séricas). O desfecho clínico (alta hospitalar ou óbito) também foi avaliado, no entanto, alguns pacientes apresentam dados faltantes.

A razão neutrófilo/ linfócito (NRL) foi calculada a partir da divisão dos valores absolutos de neutrófilos e linfócitos.

#### 5.2.4 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada pela equipe de enfermagem no início do turno da manhã dentro da rotina hospitalar. Foram coletados 12 mL de sangue venoso, sendo 8 mL obtidos em tubos à vácuo contendo EDTA e 4 mL obtidos em tubo à vácuo sem anticoagulante. Essa coleta foi obtida de todos os pacientes admitidos na UTI. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e transportadas para o Laboratório de Biologia e Imunologia do Câncer e Leishmania (LABICEL), localizado no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe.

As amostras de sangue em tubo EDTA foram direcionadas para os experimentos em citometria de fluxo, enquanto as amostras em tubo sem anticoagulante foram centrifugados (Universal 32R, Hettich, Buckinghamshire, England) a 1600g por 10 min para a separação do soro e, em seguida, o mesmo foi aliquotado e armazenado a temperatura de -80°C até o momento da análise.

#### 5.2.5 Análise das populações de células imunológicas por citometria de fluxo

Para extrair as células imunológicas, o sangue fresco com EDTA foi diluído na proporção 1:1 com salina e, posteriormente, centrifugado (400 g, 35 minutos, 25°C, sem freio e aceleração forçada) com Ficoll-Paque PLUS <sup>TM</sup> (GE Healthcare, EUA). Após a centrifugação, duas nuvens foram detectáveis: a primeira constituída de células mononucleares (PBMC) e a segunda banda enriquecida por granulócitos ou células polimorfonucleares (PMN). Para os fins desse estudo, somente a nuvem de polimorfonucleares foram utilizadas; sendo que estas foram coletadas com cuidado e, transferidas para novos tubos. Em seguida, essas células granulocíticas passaram por duas ou três etapas de hemólise, a fim de diminuir a proporção de hemácias contidas nessa amostra, para em seguida ser lavada com solução salina e, centrifugada a 400 g, 10 minutos, 15°C, freio e aceleração de 7 (Eppendorf Centrifuge 5804R).

Após estas lavagens, as células foram ressuspensas em 500 µL de Fc Block contendo RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), sendo que o Fc block, solução de bloqueio das frações Fc inespecíficas, é composto por 2% de soro fetal de cabra e 2% de soro bovino fetal, a fim de bloquear as células para marcações inespecíficas. Estes tubos de células com Fc block foram incubados à 4°C por 30 minutos. Posteriormente, as células

foram contadas em microscópio e plaqueadas na quantidade de  $1 \times 10^6$  por poço em placa de 96 poços, para posterior marcação dos receptores de superfície.

As células polimorfonucleares do sangue periférico foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais desenhados em painéis. Para caracterizar as populações de células estudadas, foram utilizados os anticorpos monoclonais descritos na Quadro 1. Além disso, quatro poços foram plaqueados apenas com células de pacientes sem anticorpos para servir de controle da autofluorescência das células e dois poços com células de voluntários sadios, a fim de servir de controle interno do experimento.

Após incubação de 30 minutos, as células foram lavadas mais duas vezes com tampão PBS e, então, foram fixadas com a adição de 200  $\mu$ L de formaldeído nos poços por até 24 horas. Então, as células foram ressuspensas em 300  $\mu$ L de PBS e centrifugadas (400 g, 5 minutos, 4°C, freio e aceleração de 8). As amostras foram adquiridas no Citômetro de Fluxo Attune™ NxT usando o software versão 2.4 (Life Technologies, CA, EUA). Os dados foram analisados usando o software FlowJo versão V10 (Treestar Inc, Ashland, EUA).

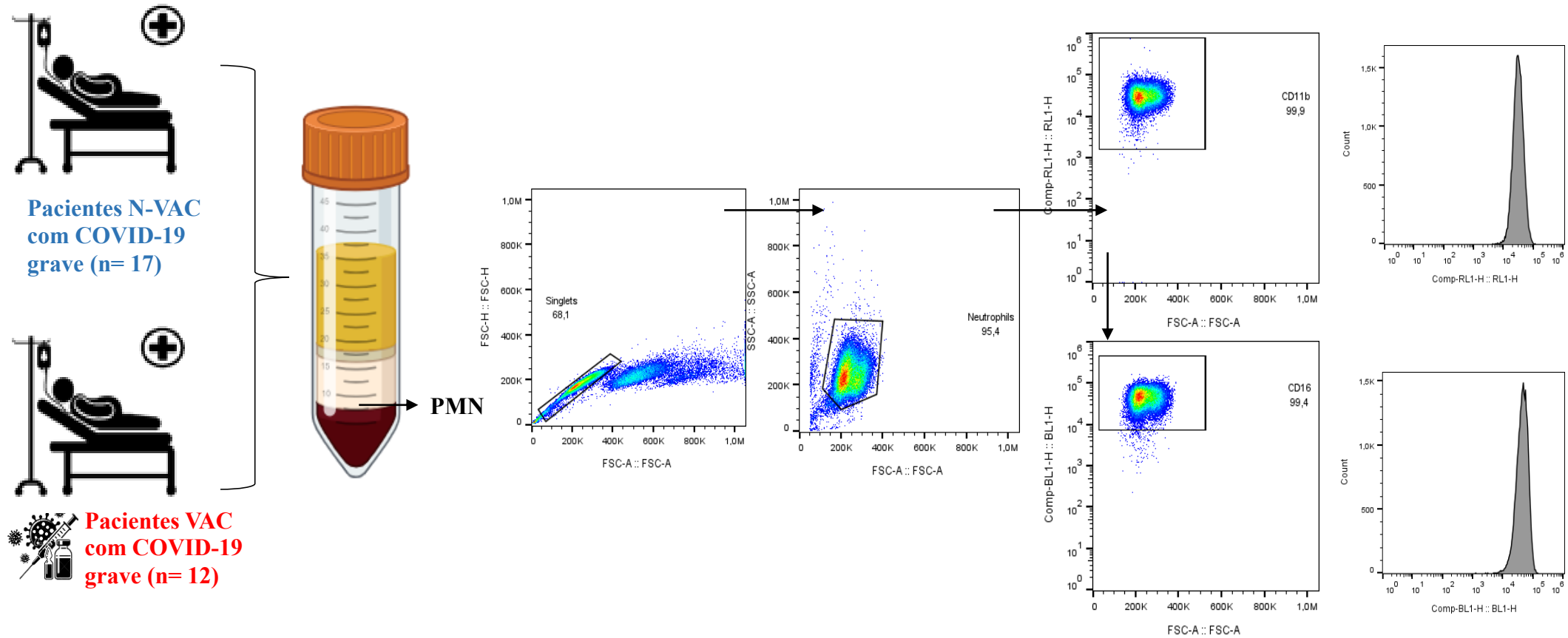
A Figura 8 ilustra o passo-a-passo desde a extração das nuvens de neutrófilos a partir das amostras de sangue periférico, conforme descrito anteriormente, seguindo para as estratégias utilizadas na seleção das populações celulares. A análise no FlowJo seguiu-se, consecutivamente, da delimitação de *singlets* e populações células de neutrófilos a partir dos parâmetros de tamanho (Forward Scatter Area; FSC-A) e granulosidade (Side Scatter Area; SSC-A). Separadamente em painéis diferentes, foram selecionadas as células CD11b<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> na região dos neutrófilos (STAATS et al., 2019).

Os valores estatísticos disponíveis no software FlowJo foram usados para relatar a frequência relativa de cada população de células imunológicas e os valores de intensidade de fluorescência são relatados como MFI.

**Quadro 1** Anticorpos utilizados nos experimentos da citometria de fluxo.

| <b>Anticorpo</b> | <b>Fluorocromo</b> | <b>Clone</b>   | <b>Fornecedor</b> | <b>Número do catálogo</b> | <b>Fator de diluição</b> | <b>População celular</b> | <b>Atividade relacionada ao receptor (BD BIOSCIENCES, 2011)</b> |
|------------------|--------------------|----------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| CD11b            | APC                | ICRF44         | BD                | 4330081                   | 1:150                    | Neutrófilos              | Adesão celular                                                  |
| CD16             | FITC               | 3G8            | BD                | 555406                    | 1:30                     | Neutrófilos              | Fagocitose ou citotoxicidade dependente de anticorpo            |
| CD182            | PerCP-eFluor 710   | Ebio5EB-C7-F10 | Invitrogen        | 46182942                  | 1:100                    | Neutrófilos              | Quimiotaxia, liga-se a IL-8                                     |
| CD274            | PE                 | MIH1           | BD                | 557924                    | 1:30                     | Neutrófilos              | Atividade supressora sobre outras células, liga-se ao CD279     |
| HLA-DR           | Alexa Fluor 700    | LN3            | Invitrogen        | 56995642                  | 1:80                     | Neutrófilos              | Apresentação de antígeno a células T                            |
| TREM-1           | PE                 | TREM-26        | BioLegend         | 314906                    | 1:200                    | Neutrófilos              | Amplificação da resposta inflamatória                           |

**Figura 8** Estratégias de seleção das populações de neutrófilos. De cada grupo foi coletado uma mostra de sangue periférico, que ainda, fresco, foi direcionado para as etapas de extração de células imunológicas por citometria de fluxo. Após aquisição das amostras os dados foram encaminhados para o Flow Jo, conforme indicado na figura. Legenda: PMN: células polimorfonucleares; N: número amostral; N-VAC: não vacinados, VAC: vacinados.



### 5.2.6 Análise dos marcadores inflamatórios no soro

A forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1, R&D systems, Minneapolis, EUA) e as concentrações da interleucina 6 (IL-6, Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, EUA) foram avaliadas no soro utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), seguindo as instruções dos fabricantes. Ao final, as placas foram lidas em um espectrofotômetro Epoch BioTek (Agilent, Luzern, Suíça) com comprimento de onda de 450 a 570 nm. Uma curva padrão era gerada para cada conjunto de amostras testadas, segundo as instruções do fabricante.

### 5.2.7 Dosagem de citocinas no soro

As citocinas: GM-CSF; IFN- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-12 p70; IL-13; IL-18; e TNF- $\alpha$ , foram quantificadas no soro dos pacientes COVID-19 graves vacinados e não vacinados. Foi realizado ensaio multiplex utilizando um kit ProcartaPlex™ Panel (Th1/Th2 Cytokine 11 Plex-ProcartaPlex™) (ThermoFisher Scientific, MA, EUA) e a dosagem foi realizada pelo uso do equipamento Luminex® 100/200 (Luminex Corp., TX, EUA).

De maneira breve: a placa foi sensibilizada com as *beads* de captura por cerca de 12 h à 4 °C e sob agitação. Em seguida, a placa foi lavada com solução específica de lavagem e as amostras foram adicionadas e incubadas por 2h. Posteriormente, as placas foram lavadas e o anticorpo de detecção foi adicionado por 30 minutos, seguido de lavagens da placa e adição da estreptavidina-PE. Após 30 min, as placas foram lavadas e o tampão de leitura foi adicionado.

### 5.2.8 Análises estatísticas

Primeiramente todos os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, de acordo com a distribuição dos dados, os mesmos foram apresentados como média e desvio padrão. Em seguida, o teste exato de Fisher foi aplicado a fim de investigar diferenças nas variáveis de caracterização entre os grupos VAC (vacinados) e N-VAC (não vacinados). Para analisar os níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para identificar diferenças significantes na frequência ou expressão dos receptores celulares e/ou fenótipos imunológicos entre os grupos N-VAC e VAC foi aplicado o teste múltiplo de Mann-Whitney.

O coeficientes R de *Sperman* foi aplicado para avaliar a existência de correlação entre as concentrações periféricas de células imunológicas estudadas, citocinas, marcadores laboratoriais e receptores de superfície dos neutrófilos. Correlações fortes foram consideradas quando o coeficiente R de *Spearman* foi  $\leq -0,70$  ou  $\geq 0,70$ .

O nível de significância assumido para as análises foi de 5%. As análises estatísticas e figuras foram desenvolvidas no software GraphPad Prism versão 9.4 (San Diego, EUA) e do R Studio versão 4.4.1..

### 5.3 Resultados

#### 5.3.1 Dados demográficos, características clínicas e laboratoriais

Todos os pacientes com COVID-19 incluídos nesse estudo foram admitidos em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e os dados clínicos e laboratoriais apresentados na Tabela 2, destacando o estado grave de ambos os grupos. No total, foram recrutados 29 pacientes com COVID-19 confirmada laboratorialmente, categorizados em pacientes não vacinados (N-VAC= 17) e vacinados (VAC=12). A média de idade foi de 56,7 anos para os pacientes não vacinados e 58,25 anos para os vacinados com COVID-19. O número de comorbidades (obesidade, diabetes mellitus e hipertensão sistêmica arterial) foi maior entre os pacientes não vacinados em relação aos vacinados, mas nenhum desses fatores apresentou associação estatística significativa.

A partir disso, observando os dados laboratoriais, a média das contagens absolutas de eritrócitos foi de 5,48 milhões por microlitro nos pacientes N-VAC e de 3,20 milhões por microlitro nos VAC. Por conseguinte, a média do valor de hemoglobina foi similar entre pacientes VAC e N-VAC e, ambas abaixo do valor de referência (Tabela 2).

Com relação à média de leucócitos totais, os pacientes N-VAC apresentaram maior média ( $19052,00 \pm 10963,00$ ) em relação aos vacinados ( $14612,67 \pm 4579,01$ ). No entanto, não houve diferença na média das contagens absolutas de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos entre os grupos. Entretanto, ao analisar as médias obtidas em relação ao valor de referência, é possível observar que os pacientes N-

VAC e VAC apresentaram média de neutrófilos acima do valor de referência, enquanto que os N-VAC e VAC apresentaram linfopenia (Tabela 2).

A razão neutrófilo/linfócito (NRL) de ambos os grupos não apresentaram diferenças estatísticas; no entanto, ao analisar os valores obtidos observamos que os pacientes VAC apresentaram maior média em relação aos N-VAC (Tabela 2).

Os pacientes incluídos no estudo apresentaram a média da ureia sérica acima do valor de referência, esse mesmo metabólito foi visualmente maior nos pacientes VAC ( $91,32 \pm 48,93$ ), apesar de não ser uma diferença significativa. Também não houve diferença na média da creatinina sérica entre os grupos estudados (Tabela 2).

Somados, os dados laboratoriais encontrados nos pacientes incluídos nos dois grupos contribuem para caracterizar o quadro grave da doença em ambos os grupos.

**Tabela 2** Caracterização dos pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados.

| Variáveis                                | Vacinados<br>(VAC = 12) | Não-Vacinados<br>(N-VAC= 17) | P                  | Referência de<br>normalidade |
|------------------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|
| <b>Características gerais</b>            |                         |                              |                    |                              |
| Idade (média ± SD)                       | 58,25 ± 16,27           | 56,7 ± 22,77                 | 0.836 <sup>a</sup> | -                            |
| Sexo (%)                                 |                         |                              |                    |                              |
| Feminino                                 | 8 (66,7)                | 8 (47,1)                     | 0.451 <sup>b</sup> | -                            |
| Masculino                                | 4 (33,3)                | 9 (52,9)                     |                    | -                            |
| Obesidade (%)                            |                         |                              |                    |                              |
| Sim                                      | 4 (33,3)                | 2 (11,8)                     | 0.198 <sup>b</sup> | -                            |
| Não                                      | 8 (66,7)                | 15 (88,2)                    |                    | -                            |
| Diabetes Mellitus (%)                    |                         |                              |                    |                              |
| Sim                                      | 7 (58,3)                | 11 (64,7)                    | 0.999 <sup>b</sup> | -                            |
| Não                                      | 5 (41,7)                | 6 (35,3)                     |                    | -                            |
| Hipertensão Arterial Sistêmica (%)       |                         |                              |                    |                              |
| Sim                                      | 7 (58,3)                | 13 (76,5)                    | 0.422 <sup>b</sup> | -                            |
| Não                                      | 5 (41,7)                | 4 (23,5)                     |                    | -                            |
| Desfecho Clínico <sup>#</sup>            |                         |                              |                    |                              |
| Óbito                                    | 1                       | 2                            | 0.999 <sup>b</sup> | -                            |
| Sobrevivência*                           | 11                      | 10                           |                    | -                            |
| <b>Dados laboratoriais</b>               |                         |                              |                    |                              |
| Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /uL)       | 3,20 ± 0,52             | 5,48 ± 6,27                  | 0.565 <sup>a</sup> | 3,90 – 5,20                  |
| Hemoglobina (g/dL)                       | 8,99 ± 1,16             | 9,06 ± 1,16                  | 0.884 <sup>a</sup> | 11,70 – 15,70                |
| Hematócrito (%)                          | 28,35 ± 4,39            | 26,38 ± 3,65                 | 0.247 <sup>a</sup> | 36,00 – 47,00                |
| Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /uL)         | 221,27 ± 131,76         | 290,27 ± 144,61              | 0.347 <sup>a</sup> | 150,00 – 450,00              |
| Leucócitos Totais (x10 <sup>3</sup> /uL) | 14612,67 ± 4579,01      | 19052,00 ± 19063,00          | 0.524 <sup>a</sup> | 4,00 – 11,00                 |
| Neutrófilos (%)                          | 83,10 ± 8,71            | 85,17 ± 7,38                 | 0.600 <sup>a</sup> | 40,00 – 70,00                |
| Eosinófilos (%)                          | 2,40 ± 2,82             | 2,03 ± 2,25                  | 0.561 <sup>a</sup> | 1,00 – 5,00                  |
| Basófilos (%)                            | 0,42 ± 0,18             | 0,43 ± 0,23                  | 0.875 <sup>a</sup> | 0,00 – 1,00                  |
| Linfócitos (%)                           | 9,36 ± 6,28             | 5,95 ± 4,90                  | 0.211 <sup>a</sup> | 20,00 – 40,00                |
| Monócitos (%)                            | 4,40 ± 1,74             | 5,80 ± 4,80                  | 0.155 <sup>a</sup> | 2,00 – 12,00                 |
| Razão NRL <sup>§</sup>                   | 16,49 ± 13,66           | 11,75 ± 14,93                | 0.216 <sup>a</sup> | -                            |
| Ureia Sérica (mg/dL)                     | 91,32 ± 48,93           | 76,25 ± 36,22                | 0.540 <sup>a</sup> | 10,00 – 45,00                |
| Creatinina Sérica (mg/dL)                | 1,35 ± 0,87             | 1,32 ± 1,26                  | 0.468 <sup>a</sup> | 0,60 – 1,20                  |

Os dados são apresentados como média e desvio padrão de acordo com a distribuição não normal. Razão NRL: razão entre número absoluto de neutrófilos por linfócitos; A porcentagem de leucócitos foi calculada de acordo com o total de leucócitos de cada paciente. <sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney; <sup>b</sup> Teste de Fisher's; <sup>§</sup> Razão Neutrófilo/Linfócito (unidades arbitrárias); \*Alguns dados estavam ausentes dos registros; P indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2 Análise dos níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 em pacientes COVID-19 graves não vacinado e vacinados.

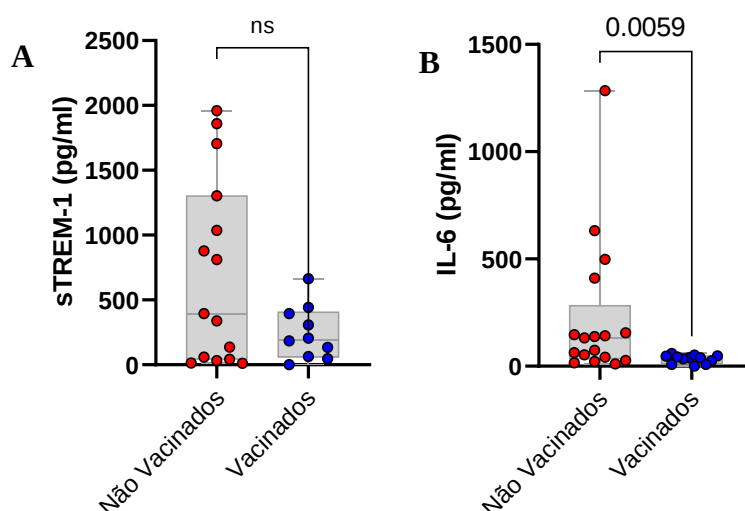
Uma vez que os estudos prévios demonstraram que os níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 estão relacionados ao perfil de gravidade dos pacientes COVID-19, avaliamos estes biomarcadores em pacientes graves antes e após a vacinação.

Com a avaliação dos níveis séricos de sTREM-1 e IL-6, biomarcadores inflamatórios envolvidos na gravidade da COVID-19, foi observado que indivíduos

vacinados apresentam menores concentrações dessas moléculas (Figura 9). Os níveis de sTREM-1 (Figura 8A) foram maiores em pacientes COVID-19 N-VAC (média  $726,4 \pm 11,37$ ; 71991), em relação aos VAC (média  $444 \pm 0,0$ ; 1487), não apresentando diferença estatística entre os grupos.

A média dos níveis de IL-6 (Figura 9B) foi maior nos pacientes N-VAC ( $226,4 \pm 11,10$ ; 1285) em relação aos VAC ( $33,87 \pm 1,23$ ; 59,17) apresentando diferença estatística entre os grupos com valor de  $p = 0,0059$ .

**Figura 9** Níveis séricos de sTREM-1 e IL-6 em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC,  $n = 17$ ; VAC,  $n = 12$ ). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo.



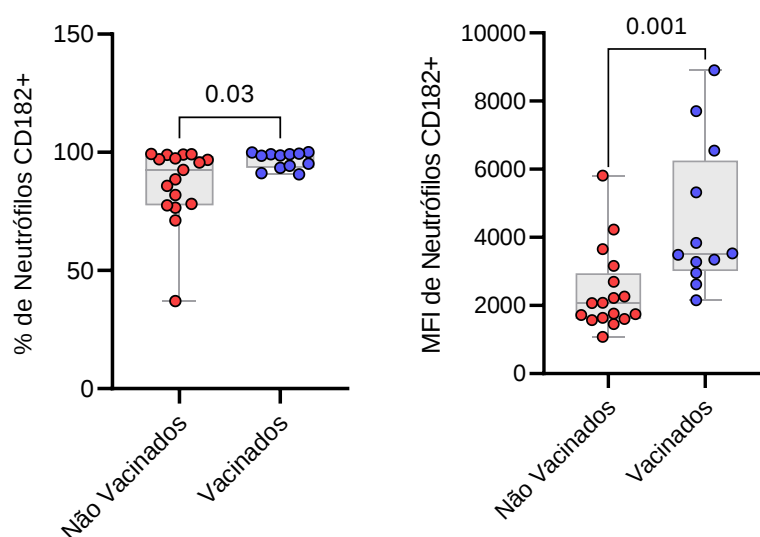
### 5.3.3 Análise dos marcadores de superfície expressos em neutrófilos avaliados através da citometria de fluxo

Para avaliar o perfil fenotípico e funcional dos neutrófilos através da expressão de marcadores de superfície em pacientes COVID-19 graves após a vacinação, realizamos a extração dessas células imunes no sangue periférico de pacientes não vacinados e vacinados e estas foram examinadas através da citometria de fluxo observando a frequência relativa de cada população de neutrófilos, juntamente com os valores de intensidade de fluorescência, MFI.

A população de neutrófilo estudada foi caracterizada como células  $CD11b^+CD16^+$ . Dentro dessa população de neutrófilos, foi analisada a expressão do receptor de quimiotaxia (CD182) (Figura 10), o qual avalia a capacidade dos neutrófilos

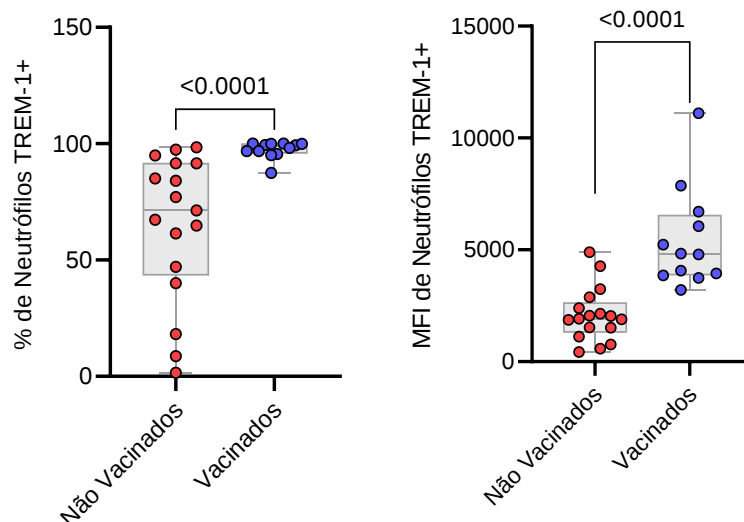
migrarem da circulação para o local de inflamação, sendo que os pacientes VAC apresentaram maior porcentagem de neutrófilos quanto MFI em relação aos não vacinados, com valor de  $p=0,003$  e  $p=0,001$ , respectivamente.

**Figura 10** Análise da expressão do marcador de superfície CD182 na população de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC,  $n = 17$ ; VAC,  $n= 12$ ). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando CD182.



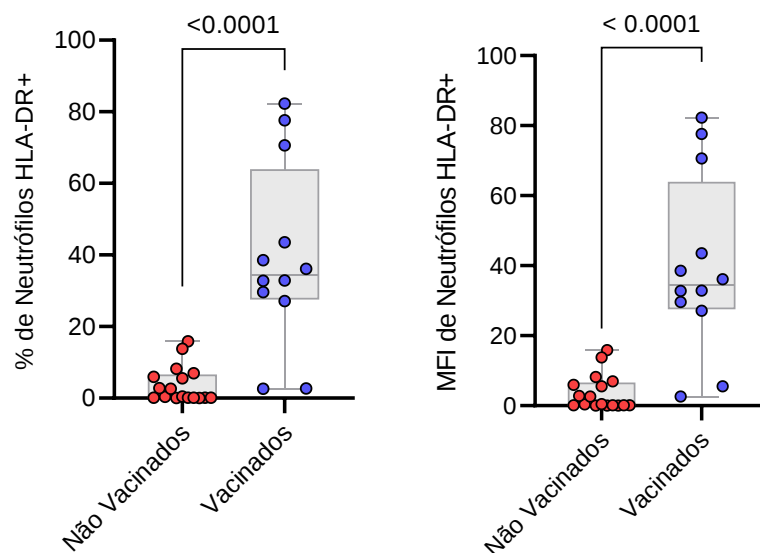
Quanto a expressão do TREM-1, receptor de inflamação, os neutrófilos dos pacientes vacinados apresentam maior expressão tanto na porcentagem de células quanto no MFI, com valor de  $p<0,0001$  (Figura 11).

**Figura 11** Análise do receptor de superfície expresso em células mielóides tipo 1 (TREM-1) de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e acinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando TREM-1.

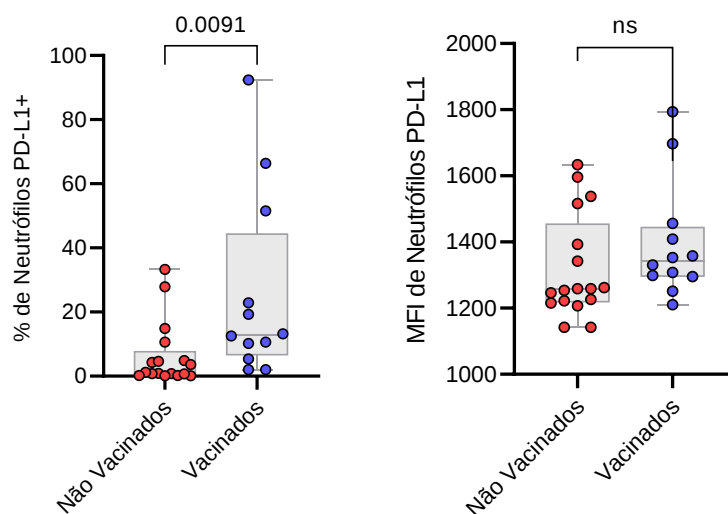


Em continuidade, os neutrófilos CD11b<sup>+</sup> dos pacientes VAC apresentaram um maior percentual de neutrófilos expressando HLA-DR e um maior MFI de HLA-DR<sup>+</sup> (Figura 12), com valor de  $p < 0.0001$  e  $p = 0.002$ , respectivamente. Enquanto que, os pacientes N-VAC apresentaram menor porcentagem de neutrófilos expressando PD-L1 (CD274), com valor de  $p = 0.0091$  (Figura 13).

**Figura 12** Avaliação da expressão de marcador de imunossupressão, HLA-DR, na população de neutrófilos CD11b<sup>+</sup> de pacientes COVID-19 graves vacinados e não vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência) de neutrófilos expressando HLA-DR).



**Figura 13** Avaliação da expressão do marcador de imunossupressão, PD-L1, na população de neutrófilos CD11b<sup>+</sup> de pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Legenda: MFI (valor de intensidade de imunofluorescência).



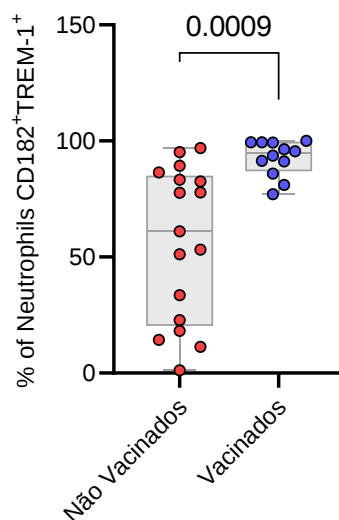
### 5.3.4 Análise do perfil funcional dos neutrófilos por citometria de fluxo

Para avaliar o perfil funcional dos neutrófilos em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados, foram analisados os seguintes painéis:

- Inflamação: CD182<sup>+</sup> TREM-1<sup>+</sup>
- Imunorregulação: CD274<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>

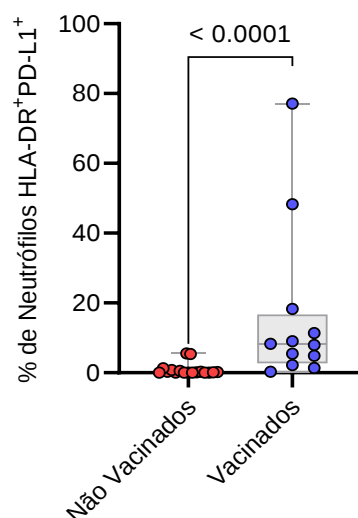
Após a análise do fenótipo inflamatório nos neutrófilos, foi possível observar que os pacientes COVID-19 graves vacinados expressaram mais CD182<sup>+</sup>TREM-1<sup>+</sup> (Figura 14) ( $p=0.0009$ ) em relação aos não vacinados.

**Figura 14** Avaliação da expressão do fenótipo inflamatório na população de neutrófilos CD11b+CD16+ em pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo.



Em relação ao fenótipo imunorregulador (HLA-DR<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>), os pacientes vacinados apresentaram maior porcentagem de neutrófilos com esse perfil, com valor de  $p<0.0001$  (Figura 15).

**Figura 15** Avaliação da expressão do fenótipo imunorregulador em neutrófilos de pacientes COVID-19 graves não vacinados e vacinados. Os gráficos são representados em boxplots com valores médios  $\pm$  mínimos e máximos (cada ponto representa um paciente) (N-VAC, n = 17; VAC, n= 12). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$  foi considerado significativo.



#### 5.3.4 Correlações entre a caracterização celular dos neutrófilos com os marcadores imunológicos e laboratoriais dos pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados

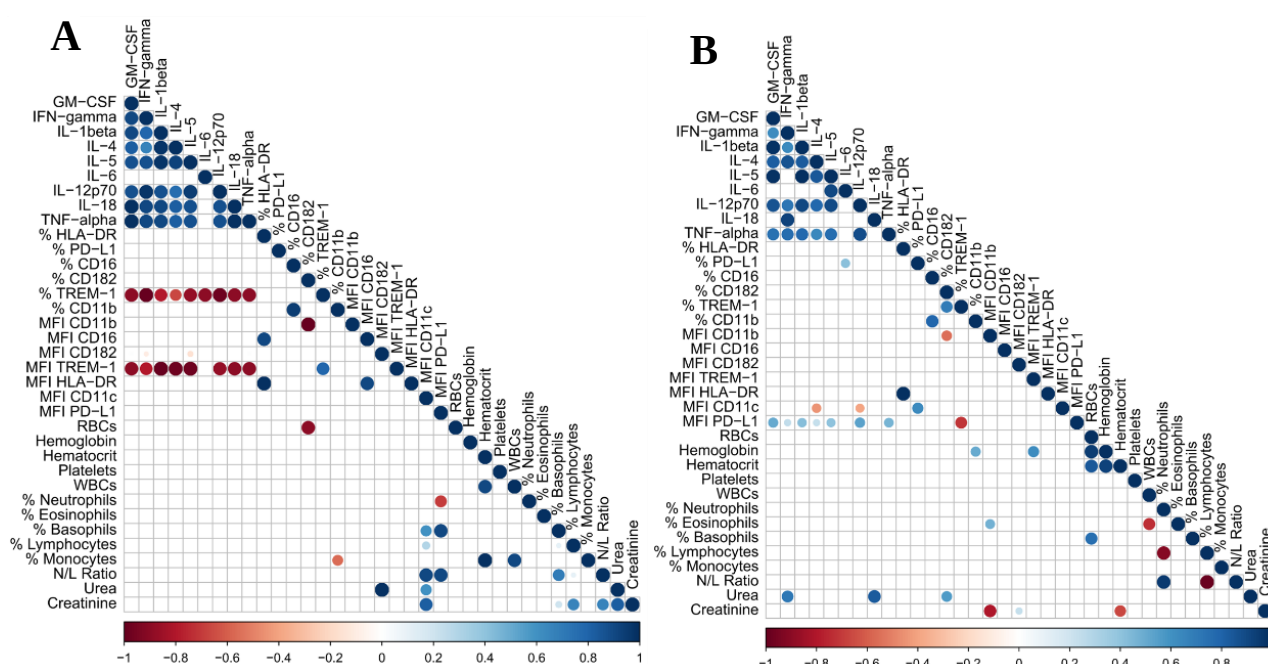
Os pacientes com COVID-19 grave não vacinados e vacinados apresentaram diversas correlações entre os receptores de superfície expresso em neutrófilos (CD182, TREM-1 e PD-L1) com as citocinas (IL-18, IL-6, IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) dosadas através do LUMINEX e, com os dados laboratoriais dos pacientes descritas a seguir.

Destacando, em pacientes com N-VAC (Figura 16A), observamos que as citocinas, exceto a IL-6, se correlacionaram entre si. A frequência do receptor TREM-1 mostrou uma forte correlação negativa com GM-CSF ( $\rho = -0,882$ ,  $p = 3,079$ ), IFN- $\gamma$  ( $\rho = -0,892$ ,  $p = 1,60$ ), IL-12p70 ( $\rho = -0,774$ ,  $p = 1,70$ ), IL-18 ( $\rho = -0,750$ ,  $p = 0,018$ ) e TNF- $\alpha$  ( $\rho = 0,750$ ,  $p = 2,72$ ). Também foram detectadas associações negativas significativas fortes entre a TREM-1 MFI e os níveis de diferentes citocinas, como GM-CSF ( $\rho = -0,84$ ,  $p = 9,74$ ) e IL-5 ( $\rho = -0,77$ ,  $p = 9,55$ ).

Por outro lado, o grupo de pacientes VAC (Figura 16B) apresentou menos correlações entre os marcadores imunológicos e clínicos em comparação com o N-VAC. Em geral, a expressão dos níveis de citocinas se correlacionou entre si. A frequência de

PD-L1 correlacionou-se positivamente com os níveis de IL-6 ( $\rho = 0,56$ ,  $p = 0,042$ ). Embora o MFI do receptor PD-L1 tenha apresentado correlações positivas com as citocinas, essas foram consideradas correlações fracas. Também foi encontrada uma associação negativa entre a frequência de TREM-1 e a MFI do receptor PD-L1 ( $\rho = -0,371$ ,  $p = 0,210$ ). Por fim, foram encontradas correlações entre os níveis de ureia e as citocinas IFN- $\gamma$  ( $\rho = 0,711$ ,  $p = 0,384$ ) e IL-18 ( $\rho = 0,833$ ,  $p = 0,008$ ).

**Figura 16** Análises de correlação dos marcadores imunológicos e laboratoriais dos pacientes COVID-19 grave, utilizando o R Studio.



## 5.4 Discussão

Os resultados deste estudo revelam marcadores imunológicos associados à gravidade da COVID-19, destacando-se atividades inflamatórias e reguladoras dos neutrófilos dos pacientes vacinados e não vacinados, juntamente com a presença de citocinas que fazem parte da imunopatologia ocasionada pela infecção do vírus SARS-CoV-2.

Os grupos experimentais (VAC vs N-VAC) do presente estudo não foram estatisticamente comparáveis com relação aos parâmetros laboratoriais (hemograma, leucograma e plaquetas) e clínicos avaliados (comorbidades, ureia, creatinina,

sobrevivência/óbito), sendo compreensível observar a ausência de diferença entre esses parâmetros, uma vez que ambos apresentavam quadros graves da doença e estavam internados na UTI.

É importante destacar que os pacientes N-VAC e VAC diferiram significativamente com relação os níveis séricos de IL-6 ( $p=0,0059$ ), onde os N-VAC apresentaram maiores níveis séricos, consequentemente apresentam um processo inflamatório mais intenso. Isto é de particular importância no contexto do estudo atual, uma vez que essa mudança de perfil pró-inflamatório para anti-inflamatório, mediante a concentração sérica de IL-6 como observado por Wang e cols. (2022), induzida pela vacinação, foi visualizada nos pacientes COVID-19 grave vacinados. Essa interleucina consiste em uma citocina pró-inflamatória, que já foi relatada por participar de distúrbios inflamatórios, incluindo infecções virais; estando presente no desenvolvimento da tempestade de citocinas na COVID-19. A IL-6 é produzida mediante o estímulo de monócitos e macrófagos frente a infecções ou lesões teciduais, que estimulam PRR's à PAMP's e DAMP's aumentando os níveis séricos (WANG et al., 2022).

Ao analisarmos os níveis séricos de sTREM-1 e IL-6, nos pacientes em estudo, observamos que os pacientes vacinados apresentaram menor concentração sérica desses dois marcadores imunológicos; o que nos faz inferir que, a vacinação, como abordagem terapêutica pode ter ocasionado uma modulação da resposta imune frente a infecção viral. Van Singer e cols. (2021) e De Nooijer e cols. (2021) relataram que, as concentrações de sTREM-1 e IL-6 podem ser utilizadas como parâmetros de triagem para decidir a terapêutica a ser realizada nos pacientes com COVID-19.

Em nosso estudo foi observado um aumento do nível sérico de sTREM-1 em pacientes com COVID-19 grave; porém, não houve diferença estatística entre os pacientes vacinados e não vacinados. Em nossa metanálise (DE OLIVEIRA et al., 2022), observamos um aumento do nível sérico de sTREM-1 em pacientes infectados em comparação com indivíduos saudáveis, demonstrando a relação desse marcador inflamatório na COVID-19. Os níveis plasmáticos elevados de sTREM-1 em pacientes COVID-19 grave não vacinados, encontrados em nosso estudo, podem ser indicativos de uma resposta inflamatória excessiva e estar contribuindo para a progressão da doença. No entanto, já foi relatado que a infecção causada pelo SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro pode ocasionar uma maior liberação de citocinas e um estado

hiperinflamatório, como consequência de uma desregulação da resposta imune (SHI et al., 2020; TAN et al., 2020).

No presente estudo, 2 (8,5%) pacientes não vacinados e 1 (12%) paciente vacinado foram à óbito. No entanto, é fundamental destacar que, a ausência de dados referentes ao número de óbitos dos pacientes deste estudo, impossibilitou uma melhor associação entre vacinados e não vacinados com o do desfecho clínico de óbito. Segundo dados epidemiológicos, o período do nosso estudo compreendeu duas ondas da infecção, a primeira com prevalência das variantes B.1, B.1.1.33, B.1.1.119 e B.1.1.28 (setembro a dezembro de 2020), e a segunda com predomínio da variante Delta (setembro a dezembro de 2021 e janeiro de 2022) (DOS SANTOS et al., 2021; FREITAS et al., 2023). A necessidade do uso de suporte invasivo de oxigênio (ventilação mecânica) consiste em um sinal de COVID-19 grave, estando associada ao desfecho de morte (CHEN et al., 2020). Além disso, pacientes que desenvolvem sintomas mais graves da doença apresentam intensa resposta inflamatória associada à infecção por SARS-CoV-2 e, geralmente necessitam de internação em UTI (GREWAL; BUECHLER, 2023; DAVITTI et al., 2022). Segundo Armstrong e cols. (2020), a taxa de mortalidade em pacientes com COVID-19 na UTI pode variar de 0 a 84,6%.

Observamos nesse estudo que, a média da contagem de neutrófilos em pacientes vacinados foi de  $83,10 \pm 8,71$  e não vacinados de  $85,17 \pm 7,38$ , ambos acima do valor de referência; demonstrando assim o maior recrutamento dessas células de defesa a fim de controlar a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2. Em consonância com relatos anteriores (BARNES et al., 2020; XIA et al., 2020), observamos aumento na contagem de leucócitos e proporções aumentadas de neutrófilos em pacientes com COVID-19 grave. Dos parâmetros avaliados, cabe destacar os relacionados à resposta imune como a linfopenia, e a neutrofilia que consiste em um biomarcador de infecção aguda, uma vez que os neutrófilos desempenham importante papel na resposta imune inata e, seu aumento já foi relacionado a resultados adversos, inflamação, em pacientes com COVID-19 (HENRY et al., 2020).

Diversos estudos já relataram o papel da NRL na distinção entre casos de COVID-19 não graves e graves, incluindo a necessidade da internação em UTI (McKENNA et al., 2022; JIMENO et al., 2021; ZHOU et al., 2020). Em nosso estudo, os pacientes com COVID-19 grave vacinados apresentaram maior média de NRL em relação aos não vacinados com valor de  $p=0,216$ .

Os neutrófilos são importantes células de defesa imune inata. Estudos com COVID-19 já mostraram associação dessas células com a progressão da doença (PURBEY et al., 2023; HENRY et al., 2020). No entanto, em relação a sua funcionalidade ainda existem lacunas que precisam ser compreendidas. Nesse estudo foi observado que, os pacientes COVID-19 grave vacinados apresentaram uma maior população de neutrófilos ativados expressando receptores de superfície relacionados a quimiotaxia (CD182), inflamação (TREM-1), a regulação da resposta imune (PD-L1) e apresentação de antígenos (HLA-DR) para células da resposta adaptativa.

Remy e cols. (2020) e Ritchie e Singanayagam (2020) relataram que a desregulação imunológica já foi observada em infecções graves e na sepse, caracterizando uma progressão de estados hiperinflamatórios para imunossupressão, sendo que mecanismos similares foram propostos para a COVID-19 grave (GIAMMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2019). Trabalhos anteriores demonstraram a importância de neutrófilos apresentarem HLA-DR como molécula de ativação. Achados similares foram vistos na avaliação de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup> em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (SCRIMINI et al., 2013). De maneira similar à COVID-19, a gravidade dessas duas doenças está associada a um perfil inflamatório exacerbado.

A análise da expressão dos marcadores de superfície nos neutrófilos revelou ainda uma heterogeneidade fenotípica nessas células, que pode ser devido a condição patológica ocasionada pela infecção grave no contexto da mielopoiese de emergência para combater a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2, como já visualizado por Schultze e cols. (2019), estando associada a respostas imunes disfuncionais, marcadas por inflamação (CD182<sup>+</sup>TREM-1<sup>+</sup>) e imunorregulação (HLA-DR<sup>+</sup>PD-L1<sup>+</sup>) combinadas, como observado em nossa população. Neutrófilos com esse perfil apresentam-se mais ativados e com capacidade de realizar a degranulação, oxidação, bem como ocasionar mais inflamação. Além disso, a presença desses marcadores nos neutrófilos indica uma maior capacidade de controle da resposta dessas células, o que poderia contribuir para uma resposta mais efetiva e menos deletéria para os pacientes. Pilai e cols. (2018) observaram em câncer neutrófilos com perfil imunossupressor através da superexpressão de PD-L1, o qual favoreceu a não detecção das células cancerígenas pelas células T, associando-se a fenótipos mais agressivos no câncer.

O aumento da expressão dos receptores CD182 e TREM-1 foi observado nos neutrófilos, sendo que ao realizarmos essa integração à funcionalidade observamos a

presença de uma população de neutrófilos que expressa os dois receptores de maneira que à população de neutrófilos é maior nos pacientes COVID-19 grave vacinados quando comparado aos não vacinados.

É importante destacar que a expressão de moléculas de regulação não necessariamente está associada à anergia ou eficiência da resposta imune. Essas moléculas são expressas quando os neutrófilos são ativados e servem para uma melhor regulação pela imunidade adaptativa. Em resumo, a maior expressão desses marcadores em indivíduos vacinados sugere um estado mais ativado ou preparado do sistema imunológico, particularmente em termos de regulação, na apresentação de antígenos, quimiotaxia, resposta inflamatória e ativação imune. Isso pode ser um reflexo da capacidade aprimorada do sistema imunológico de responder a infecções devido a sensibilização prévia das células de defesa pela vacina. No entanto, é importante notar que essas interpretações são especulativas e baseadas nas funções gerais desses marcadores. Pesquisas adicionais, incluindo ensaios funcionais e correlação clínica, seriam necessárias para tirar conclusões definitivas.

Em relação aos níveis de ureia sérica, os pacientes COVID-19 grave vacinados e não vacinados apresentaram a média acima do valor de referência, sendo que esse mesmo metabólito foi visualmente maior nos pacientes VAC ( $91,32 \pm 48,93$ ), apesar de não haver uma diferença significativa entre os grupos. Embora não haja diferença entre os grupos de estudo, os níveis de creatinina estavam aumentados (Tabela 2). Em corroboração a esses achados, a COVID-19 tem sido amplamente associada ao dano renal agudo em pacientes graves, especialmente os internados em UTI, o que pode explicar esses achados em relação aos níveis de creatinina (POLONI, JAHNKE e ROTTA, 2020).

No presente estudo, encontramos correlações entre algumas citocinas com marcadores imunológicos e laboratoriais, conferindo assim o importante papel dessas moléculas no que tange ao desfecho da infecção, uma vez que a COVID-19 é caracterizada pelo aumento sistêmico de várias citocinas que podem contribuir para uma resposta imune disfuncional, causando uma tempestade de citocinas periféricas (HAN et al., 2020; MEHTA et al., 2020). Também observamos que pacientes gravemente vacinados contra a COVID-19 têm um receptor regulador (PD-L1) em neutrófilos, correlacionando-se positivamente com um perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-18) e negativamente com TREM-1. Como a molécula PD-L1 tem sua expressão aumentada por citocinas pró-inflamatórias, como INF- $\gamma$ , além de ser regulada

por GM-CSF, IL-4 e outras citocinas que têm uma cadeia gama comum (SABBATINO et al., 2021). Essas análises contribuem para a compreensão de que esses pacientes têm um sistema imunológico mais ativo que está preparado para controlar a infecção.

Ao final, percebemos que os pacientes COVID-19 grave vacinados apresentam um perfil inflamatório e de regulação nos neutrófilos, que se correlaciona com um perfil de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas estão correlacionadas com receptores de superfície relacionados com a capacidade de realizar a quimiotaxia (CD182), inflamação (TREM-1) e imunorregulação (PD-L1) contribuindo para a compreensão de que estes pacientes apresentam um sistema imunológico mais ativado, robusto e regulamentado para controlar a infecção.

Finalmente, reconhecemos algumas limitações em nosso estudo, uma vez que não realizamos uma análise longitudinal, bem como não tivemos informações acerca da quantidade de dias de hospitalização, desfecho de sobrevivência ou morte de todos os pacientes, quantidade de vacinas administradas, limitando assim nossa compreensão sobre o perfil de resposta dos neutrófilos dos pacientes COVID-19 grave vacinados. Nossos resultados abordam a necessidade da importância de avaliar a relação da vacinação na modulação da resposta imune, principalmente no que tange ao papel dos neutrófilos no controle da infecção viral. Ainda, nossos achados devem ser cuidadosamente interpretados, uma vez que refletem respostas imunológicas periféricas.

## 5.5 Conclusão

Os pacientes vacinados contra a COVID-19 grave apresentaram níveis séricos mais baixos de sTREM-1 e IL-6 em comparação com os pacientes não vacinados. No entanto, eles apresentaram maior expressão de receptores de superfície de neutrófilos CD182 (quimiotaxia), TREM-1 (inflamação), HLA-DR (apresentação de antígenos) e PD-L1 (regulação) e correlações significativas com citocinas pró-inflamatórias INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-18 em comparação com pacientes com COVID-19 grave não vacinados; assim, demonstrando um perfil de neutrófilos mais inflamatório e regulador nesses pacientes. Contudo, a vacinação favoreceu um estado mais ativado ou um sistema imunológico mais preparado, em termos de regulação, apresentação de antígenos, quimiotaxia, resposta inflamatória e ativação imune frente a infecção pelo SARS-CoV-2.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

A revisão sistemática e de metanálise realizada, foi a primeira a investigar os níveis de TREM-1 em infecções virais, particularmente na COVID-19. Esse estudo, evidenciou acerca da presença de níveis aumentados de sTREM-1 em pacientes com infecção por SARS-CoV-2, especialmente entre aqueles com COVID-19 grave, bem como observou que o TREM-1, tanto solúvel quanto como um marcador de superfície em leucócitos, pode estar envolvido em pneumonias virais e, é sugerido como um biomarcador de gravidade. Com isso, reforçamos a necessidade de realização de mais estudos sobre o TREM-1 em infecções virais, que podem ser clinicamente úteis na previsão de resultados e estratégias terapêuticas. No que tange ao perfil fenotípico e funcional de neutrófilos em pacientes com COVID-19, observamos alterações no perfil de resposta entre os pacientes vacinados e não vacinados, uma vez que, essas células da imunidade inata estão envolvidas na patogenicidade da infecção pelo SARS-CoV-2 e, devem ser consideradas em estudos que avaliam a atuação da vacinação, em vírus, para o controle da doença.

## 7. PERSPECTIVAS

A fim de melhor avaliar os possíveis polimorfismos existentes nos neutrófilos de pacientes positivos para COVID-19 após a vacinação, uma vez que o presente estudo apresentou limitações quanto ao número de pacientes avaliados juntamente com alguns dados laboratoriais e demográficos, foi elaborado um projeto de pós-doutorado submetido ao EDITAL FAPITEC/SE/FUNTEC – Nº 03/2024, atendendo a linha Temática 1.4.2: Saúde, que tem como proposta correlacionar os marcadores moleculares da resposta imune com o perfil de resposta adquirido pelos neutrófilos dos pacientes positivos para o vírus SARS-CoV-2, uma vez que nossa hipótese é que a vacinação altere o perfil de resposta dos neutrófilos frente a infecção pelo SARS-CoV-2, mediante a existência de polimorfismos nessas células imunológicas.

## 8. ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS AO DOUTORADO

1. **DE OLIVEIRA YLM**, DE SÁ RESENDE A, MARTINS-FILHO PR, DE MOURA TR. Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in COVID-19 and other viral pneumonias: a systematic review and meta-analysis of clinical studies. *Inflammopharmacology*. 2022 Jun;30(3):1037-1045. doi: 10.1007/s10787-022-00972-6.

(ANEXO B)

2. **DE OLIVEIRA YLM**, DE SÁ RESENDE A, FRANCA MNF, MAGALHÃES LS, CORREA CB, MOURA TR. Phenotypic and Functional Profile of Neutrophils and Immunological Biomarkers in Covid-19 Patients after Vaccination.

(Submetido à Revista *Inflammation* dia 27 de julho de 2024, ID 24c061ce-2f84-4334-9ae4-24eb16bdd967)

3. DE SÁ RESENDE A, **MATOS DE OLIVEIRA YL**, RODRIGUES DE MOURA T, MARTINS-FILHO PR. Potential role of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (TREM-1) in SARS-CoV-2 infection: First insights. *EXCLI J*. 2021 Mar 26;20:722-723. doi: 10.17179/excli2021-3581.

4. RESENDE AS, **DE OLIVEIRA YLM**, DE FRANCA MNF, MAGALHÃES LS, CORREA CB, FUKUTANI KF, LIPSCOMB MW, DE MOURA TR. Obesity in Severe COVID-19 Patients Has a Distinct Innate Immune Phenotype. *Biomedicines*. 2023 Jul 27;11(8):2116. doi: 10.3390/biomedicines11082116.

5. DE SOUZA ARAÚJO AA, QUINTANS-JÚNIOR LJ, HEIMFARTH L, SCHIMIEGUEL DM, CORRÊA CB, DE MOURA TR, CAVALCANTE RCM, GRESPAN R, DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS J, DOS SANTOS DM, DA SILVA DN, **DE OLIVEIRA YLM**, DE FRANCA MNF, DA CONCEIÇÃO SILVA M, DE SÁ DLF, DE CARVALHO FO, DE SOUZA MF, DE OLIVEIRA GÓES MA, SANTOS VS, MARTINS-FILHO PR. Dynamics of SARS-CoV-2 seroprevalence during the first year of the COVID-19 pandemic in the Northeast region of Brazil. *Pathog Glob Health*. 2023 Jul;117(5):505-512. doi: 10.1080/20477724.2022.2121366.

## 9. OUTRAS PUBLICAÇÕES

1. **MATOS DE OLIVEIRA YL**, LIMA ETS, ROTT MB, FERNANDES RPM, JAIN S, DE ARAGÃO BATISTA MV, SANTANA DOLABELLA S. Occurrence, molecular diversity and pathogenicity of *Acanthamoeba* spp. isolated from aquatic environments of Northeastern Brazil. *Int J Environ Health Res*. 2023 Dec;33(12):1686-1696. doi: 10.1080/09603123.2022.2117280.

2. DI CHRISTINE OLIVEIRA YL, **DE OLIVEIRA YLM**, CIRILO TM, FUJIWARA RT, BUENO LL, DOLABELLA SS. Inflammatory Profile of Th9 Cells and Their Protective Potential in Helminth Infections. *Immuno*. 2023; 3(2):228-236. <https://doi.org/10.3390/immuno3020015>

3. DE CARVALHO CLÍMACO M, **DE OLIVEIRA YLM**, RAMOS ACS, RAMOS-DE-SOUZA J, SILVA ARST, JAIN S, ROTT MB, SCHER R, CORREA CB, BARBOSA AAT, DOLABELLA SS. Nisin Induces Cell-Cycle Arrest in Free-Living Amoebae *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Parasitol.* 2022 Mar;67(1):511-517. doi: 10.1007/s11686-021-00436-x.
4. OLIVEIRA LM, OLIVEIRA YLDC, **OLIVEIRA YLM**, RAMOS ACS, ANDRADE GF, SÁ VL, GERALDI RM, PINHEIRO CS, BUENO LL, FUJIWARA RT, DOLABELLA SS. Intestinal polyparasitism and levels of mucosal anthelmintic SIgA in children from endemic areas in Northeastern Brazil. *Parasite Immunol.* 2022 Jan;44(1-2):e12899. doi: 10.1111/pim.12899.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: 2019.

AGRATI, C. *et al.* Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). **Cell Death & Differentiation**, v. 27, n. 11, p. 3196–3207, 8 nov. 2020.

AL-KHAWAGA, S.; ABDELALIM, E. M. **Potential application of mesenchymal stem cells and their exosomes in lung injury: an emerging therapeutic option for COVID-19 patients** *Stem Cell Research and Therapy*, BioMed Central Ltd, 1 dez. 2020.

AL-KURAISHY, H. M. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Covid-19: A new frontiers for therapeutic modality. **International Immunopharmacology**, v. 104, p. 108516, mar. 2022.

AMULIC, B. *et al.* Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 23 abr. 2012.

ANSAR, W., GHOSH, S. Inflammation and Inflammatory Diseases, Markers, and Mediators: Role of CRP in Some Inflammatory Diseases. In: **Biology of C Reactive Protein in Health and Disease**. Springer India, New Delhi, pp 67–107, 24 mar. 2016.

ARMSTRONG RA, KANE AD, COOK TM. Outcomes from intensive care in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Anaesthesia**. v. 75, n. 10, p. 1340–9, 2020.

ARRIAGA-PIZANO, L., FERAT-OSORIO, E., RODRÍGUEZ-ABREGO, G., *et al.* Differential Immune Profiles in Two Pandemic Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Waves at Pandemic Epicenter. **Archives of Medical Research**, v. 46, n. 8, p. 651–658, nov. 2015.

BALANDRÁN JC, ZAMORA-HERRERA G, ROMO-RODRÍGUEZ R, PELAYO R. Emergency Hematopoiesis in the Pathobiology of COVID-19: The Dark Side of an Early Innate Protective Mechanism. **J Interferon Cytokine Res**. v. 42, n. 8, p.393-405, 2022.

BAGUMA S, OKOT C, ALEMA NO, APIYO P, LAYET P, ACULLU D, et al. Factors Associated With Mortality Among the COVID-19 Patients Treated at Gulu Regional Referral Hospital: A Retrospective Study. **Front Public Health**. v. 10:841906, 2020.

BARNES C.O., JETTE C.A., ABERNATHY M.E., DAM K.-M.A., ESSWEIN S.R., GRISTICK H.B., MALYUTIN A.G., SHARAF N.G., HUEY-TUBMAN K.E., LEE Y.E., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. **Nature**. v. 588, p. 682–687, 2020.

BAUTISTA-BECERRIL, B. *et al.* Immunothrombosis in COVID-19: Implications of Neutrophil Extracellular Traps. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, 6 maio 2021.

BD BIOSCIENCES. **CD marker handbook**. Disponível em: <[bdbiosciences.com/eu/go/humancdmarkers](https://bdbiosciences.com/eu/go/humancdmarkers)>. Acesso em: 6 jun. 2023.

BELLOS, I., FITROU, G., DASKALAKIS, G., et al. Soluble TREM-1 as a predictive factor of neonatal sepsis: a meta-analysis. *Inflammation Research*, v. 67, p. 571–578, 11 abr. 2018.

BHARDWAJ, A. *et al.* COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 171–206, 4 mar. 2022.

BOMFIM, L.G.S., MAGALHÃES, L.S., SANTOS-FILHO, M.A.A., et al. Leishmania infantum Induces the Release of sTREM-1 in Visceral Leishmaniasis. **Frontiers Microbiology**, v. 8, 16 nov. 2017.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, fev. 2000.

BOST, P. *et al.* Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1428, 5 mar. 2021.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991–4995, 15 maio 2000.

BRASIL. **Brasil confirma primeiro caso da doença**. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46435-brasilconfirma-primeiro-caso-de-novo-coronavirus>>. Acesso em: 10 maio. 2023.

BRIZZI, A. *et al.* Spatial and temporal fluctuations in COVID-19 fatality rates in Brazilian hospitals. **Nature Medicine**, v. 28, n. 7, p. 1476–1485, 1 jul. 2022.

BROWN, C. M. *et al.* **Morbidity and Mortality Weekly Report Outbreak of SARS-CoV-2 Infections, Including COVID-19 Vaccine Breakthrough Infections, Associated with Large Public Gatherings-Barnstable County, Massachusetts, July 2021.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/large-events/>>.

BUONAGURO, L. *et al.* Innate immunity and hepatitis C virus infection: A microarrays view. **Infectious Agents and Cancer**, v. 7, n. 1, 2012.

CANDIDO, D. S. *et al.* Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1255–1260, 4 set. 2020.

CASTRO, M. C. *et al.* Spatiotemporal pattern of COVID-19 spread in Brazil. **Science**, v. 372, n. 6544, p. 821–826, 21 maio 2021.

CEVIK, M. *et al.* Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **The BMJ**, v. 371, 23 out. 2020.

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

CHEN, W. Promise and challenges in the development of COVID-19 vaccines. **Hum. Vaccin. Immunother.** v. 16, p. 2604-2608, 2020.

CHEN, Q. *et al.* Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. **Human Immunology**, v. 69, n. 3, p. 220–226, mar. 2008.

CHERIAN, S. *et al.* Sars-cov-2 spike mutations, l452r, t478k, e484q and p681r, in the second wave of covid-19 in Maharashtra, India. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2021.

CHUA, R. L. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 970–979, 26 ago. 2020.

COLONNA M. TREMs in the immune system and beyond. **Nature Reviews**

**Immunology**, v. 3, p. 445–453, jun. 2003.

COLONNA, M.; FACCHETTI, F. TREM-1 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells): A New Player in Acute Inflammatory Responses. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. s2, p. S397–S401, 15 jun. 2003.

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

COSTA, K. T. DA S. *et al.* Evaluation of the epidemiological behavior of mortality due to COVID-19 in Brazil: A time series study. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0256169, 12 ago. 2021.

CUI, L. *et al.* The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 9029–9043, set. 2015.

CUI C, SCHOENFELT KQ, BECKER KM, BECKER L. Isolation of polymorphonuclear neutrophils and monocytes from a single sample of human peripheral blood. **STAR Protoc.** v. 2, n. 4, p. 100845, 2021.

DA SILVA-NETO, P. V. *et al.* Strem-1 predicts disease severity and mortality in covid-19 patients: Involvement of peripheral blood leukocytes and mmp-8 activity. **Viruses**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2021.

DAVITT, E. *et al.* COVID-19 disease and immune dysregulation. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 35, n. 3, p. 101401, set. 2022.

DE NOOIJER, A. H. *et al.* Increased sTREM-1 plasma concentrations are associated with poor clinical outcomes in patients with COVID-19. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 7, 1 jul. 2021.

DE OLIVEIRA, Y. L. M. *et al.* Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in COVID-19 and other viral pneumonias: a systematic review and meta-analysis of clinical studies. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 1037–1045, 28 jun. 2022.

DE OLIVEIRA MATOS, A., DOS SANTOS DANTAS, P.H., FIGUEIRA MARQUES,

SILVA-SALES, M., SALES-CAMPOS, H. The role of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in non-bacterial infections. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, p. 237–252, 24 abr. 2020.

DE SÁ RESENDE, A.; DE OLIVEIRA, Y. L. M.; *et al.* Potential role of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (TREM-1) in SARS-CoV-2 infection: First insights. **EXCLI journal**, v. 20, p. 722–723, 2021.

DHAMA, K. *et al.* **An update on SARS-CoV-2/COVID-19 with particular reference to its clinical pathology, pathogenesis, immunopathology and mitigation strategies** *Travel Medicine and Infectious Disease* Elsevier Inc., , 1 set. 2020.

DIAO, B. *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 827, 2020.

DONG, E.; DU, H.; GARDNER, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 533–534, maio 2020.

DOS RAMOS ALMEIDA CJL, VERAS FP, PAIVA IM, SCHNEIDER AH, DA COSTA SILVA J, GOMES GF, COSTA VF, SILVA BMS, CAETITE DB, SILVA CMS, SALINA ACG, MARTINS R, BONILHA CS, CUNHA LD, JAMUR MC, DA SILVA LLP, ARRUDA E, ZAMBONI DS, LOUZADA-JUNIOR P, DE OLIVEIRA RDR, ALVES-FILHO JC, CUNHA TM, DE QUEIROZ CUNHA F. Neutrophil Virucidal Activity Against SARS-CoV-2 Is Mediated by Neutrophil Extracellular Traps. **J Infect Dis.** v. 229, n. 5, p. 1352-1365, 2024.

DOS SANTOS CA, BEZERRA GV, DE AZEVEDO MARINHO AR, ALVES JC, TANAJURA DM, MARTINS-FILHO PR. SARS-CoV-2 genomic surveillance in Northeast Brazil: timing of emergence of the Brazilian variant of concern P1. **J Travel Med.** v. 28:taab066, 2021.

DU, Y., WU, T., ZHOU, X.J., *et al.* Blockade of CD354 (TREM-1) Ameliorates Anti-GBM-Induced Nephritis. **Inflammation**, v. 39, p. 1169–1176, 15 abr. 2016.

DUBAR, M., CARRASCO, K., GIBOT, S., BISSON, C. Effects of Porphyromonas gingivalis LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. 799–805, 19 mai.2018.

ELAHI S. Hematopoietic responses to SARS-CoV-2 infection. **Cell Mol Life Sci.** v. 79, n. 3, p. 187, 2022.

EKSIOGLU, E. A. *et al.* Characterization of HCV interactions with Toll-like receptors and RIG-I in liver cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 25, n. 5, fev. 2020.

FARIA, N. R. *et al.* **Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil** medRxiv [Preprint]. 2021 Mar 3:2021.02.26.21252554. doi: 10.1101/2021.02.26.21252554. Update in: Science. 2021 May 21;372(6544):815-821. doi: 10.1126/science.abh2644.

FATHI, N.; REZAEI, N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. **Cell Biology International**, v. 44, n. 9, p. 1792–1797, 3 set. 2020.

FERNANDES, Q. *et al.* **Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines, Annals of Medicine** Taylor and Francis Ltd., , 2022.

FONSECA, L. M. *et al.* Epidemiology of COVID-19 in the State of Sergipe/Brazil and Its Relationship with Social Indicators. **Epidemiologia**, v. 2, n. 3, p. 262–270, 14 jul. 2021.

FREITAS MTS, SENA LOC, FUKUTANI KF, DOS SANTOS CA, NETO FDCB, RIBEIRO JS, DOS REIS ES, BALBINO VQ, DE SÁ PAIVA LEITÃO S, DE ARAGÃO BATISTA MV, LIPSCOMB MW, DE MOURA TR. The increase in SARS-CoV-2 lineages during 2020-2022 in a state in the Brazilian Northeast is associated with a number of cases. **Front Public Health**. v. 11:1222152, 2023.

FUJINO, T. *et al.* Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, abr. 2021.

GAO, S., YI, Y., XIA, G., et al. The characteristics and pivotal roles of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in autoimmune diseases. **Autoimmunity. Reviews.**, v. 18, p. 25–35, jan.2019.

GARDIMAN E, BIANCHETTO-AGUILERA F, GASPERINI S, TIBERIO L, SCANDOLA M, LOTTI V, GIBELLINI D, SALVI V, BOSISIO D, CASSATELLA MA, TAMASSIA N. SARS-CoV-2-Associated ssRNAs Activate Human Neutrophils in a TLR8-Dependent Fashion. **Cells**. v. 11, n. 23, p. 3785, 2022.

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

GENUA, M. *et al.* The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Journal of Translational Medicine**, BioMed Central Ltd., 2014.

GHOLINATAJ JELODAR M, MIRZAEI S, DEHGHAN CHENARI H, TABKHI M. Diagnosis of the right atrial myxoma after treatment of COVID-19: A case report. **Clin Case Rep**. v. 11, n. 5, p. e7216, 2023.

GREWAL T, BUECHLER C. Adipokines as Diagnostic and Prognostic Markers for the Severity of COVID-19. **Biomedicines**. v. 11, n. 5, p. 1302, 2023.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; NETEA, M. G.; ROVINA, N.; AKINOSOGLOU, K.; ANTONIADOU, A.; ANTONAKOS, N.; DAMORAKI, G.; GKAVOGIANNI, T.; ADAMI, M. E.; *et al.* Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 6, p. 992-1000.e3, 10 jun. 2020.

GIOVANETTI, M. *et al.* Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1490–1500, 1 set. 2022.

GIBOT S. Clinical review: Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. **Critical Care**, v. 9, p. 485–489, 3 jun. 2005.

GINGRAS, M.C., LAPILLONNE, H., MARGOLIN, J.F. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 817–824, mar. 2002.

GÓMEZ-PIÑA, V., SOARES-SCHANOSKI, A., RODRÍGUEZ-ROJAS, A., *et al.* Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 4065–4073, 15 set. 2007.

GUO, W. *et al.* Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 36, n. 7, 7 out. 2020.

GUO S, LIU K, ZHENG J. The Genetic Variant of SARS-CoV-2: would It Matter for Controlling the Devastating Pandemic? **Int J Biol Sci.** v. 17, n. 6, p. 1476-1485, 2021.

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

HAN, H. *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1123–1130, 1 jan. 2020.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis Trends in Immunology. **Elsevier Ltd.**, 1 dez. 2020.

HENRY, B.M., LIPPI, G. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. **International Urology and Nephrology**, v. 52, n. 6, p. 1193-1194, jun. 2020.

HENRY, B.M. *et al.* Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clin Chem Lab Med.** v. 58, n. 7, p. 1021-1028, jun. 2020.

HIGGINS, J.P.T., THOMPSON, S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Statistics in Medicine**, v. 21, p. 1539–1558, 21 may. 2002.

HODGENS A, Gupta V (2022) Severe Acute Respiratory Syndrome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644403> (accessed 20 december 2021)

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

HOPKINS, J. **Mortality analyses of COVID-19.** Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/data/mortality>>. Acesso em: 6 jun. 2023.

HOTCHKISS, R.S.; Monneret, G.; Payen, D. Immunosuppression in Sepsis: A Novel Understanding of the Disorder and a New Therapeutic Approach. **Lancet Infect. Dis.** v. 730, n.13, p. 260–268, 2013.

HOZO SP, DJULBEGOVIC B, HOZO I. Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. **BMC Med Res Methodol.**, v. 5, n.13, 20 abr. 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-5-13>

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 6 mar. 2021.

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

IDIZ UO, YURTTAS TT, DEGIRMENCIOGLU S, ORHAN B, ERDOGAN E, SEVIK H, *et al.* Immunophenotyping of lymphocytes and monocytes and the status of cytokines in the clinical course of Covid-19 patients. **J Med Virol.** v. 94, n. 10, p. 4744–53, 2022.

JEDYNAK M, SIEMIATKOWSKI A, MROCZKO B, *et al.* Soluble TREM-1 Serum Level can Early Predict Mortality of Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 66, p. 299–306, agost. 2018.

JIMENO, S. *et al.* Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 1, 25 jan. 2021.

JIYONG J, TIANCHA H, WEI C, HUAHAO S. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in bacterial infection: a meta-analysis. **Intensive Care Med.**, v. 35, p. 587–595, abr. 2009.

JOLY, B. S.; SIGURET, V.; VEYRADIER, A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19 Intensive. **Care Medicine**, Springer, 1 ago. 2020.

KARKI, R. *et al.* **ZBP1-dependent inflammatory cell death, PANoptosis, and cytokine storm disrupt IFN therapeutic efficacy during coronavirus infection** *Sci. Immunol.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.

KARLSSON, E. K.; KWIATKOWSKI, D. P.; SABETI, P. C. **Natural selection and infectious disease in human populations** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 2014.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic Research**, v. 43, n. 1–3, p. 25–61, 9 mar. 2009.

KERGET, F. *et al.* Evaluation of the relationship between TREM-1/TREM-2 ratio and clinical course in COVID-19 pneumonia. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 10, 8 out. 2021.

KESHEH, M. M. *et al.* An overview on the seven pathogenic human coronaviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 32, n. 2, 2 mar. 2022.

KSIAZEK, T. G. *et al.* A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 15 maio 2003.

LAGUNAS-RANGEL, F. A. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, 1 out. 2020.

LEE, J. S. *et al.* Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, 10 jul. 2020.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 562–569, 24 fev. 2020.

LI, J. *et al.* Neutrophils in COVID-19: recent insights and advances. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 169, 2 ago. 2023.

LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, KATHY S.M.; *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 26 mar. 2020.

LIAO, M. *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 842–844, 1 jun. 2020a.

LIAO, R. *et al.* High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 1, 2013.

LIU, J. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, 20 maio 2020.

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

LUO X, ZHU Y, MAO J, DU R. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. **Scand J Immunol**. v. 93, n.3, mar. 2021.

MARTINS-FILHO PR, TAVARES CSS, SANTOS VS. Factors associated with mortality in patients with COVID-19. A quantitative evidence synthesis of clinical and laboratory data. **European Journal of Internal Medicine**, v. 76, p. 97–99, jun. 2020.

MARTINS-FILHO PR, ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO A, PEREIRA LX, QUINTANS-JÚNIOR LJ, DE SOUZA BARBOZA W, CAVALCANTE TF, *et al.* Factors associated with mortality among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. **Am J Trop Med Hyg**. v. 104, p. 103–105, 2021.

MATHEW, D. *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, 4 set. 2020.

MAUCOURANT, C. *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. **Science immunology**, v. 5, n. 50, 21 ago. 2020.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181–218, 2014.

MCKENNA E, WUBBEN R, ISAZA-CORREA JM, MELO AM, MHAONAIGH AU, CONLON N, O'DONNELL JS, NÍ CHEALLAIGH C, HURLEY T, STEVENSON NJ, LITTLE MA, MOLLOY EJ Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. **Front Immunol**. v. 13, p. 864387, 2022.

MEHTA, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, mar. 2020.

MENACHERY, V. D. *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1508–1513, 1 dez. 2015.

MERAD, M. *et al.* The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 11 mar. 2022.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 355–362, 17 jun. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): **Guia de Vigilância Epidemiológica do COVID-19**. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/> Acessado 10 de jan 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, COVID-19 no Brasil. Disponível em: [Covid-19 - Casos e Óbitos \(saude.gov.br\)](https://covid.saude.gov.br/) Acessado 28 de jun 2024.

MISTRY, P. *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity **Frontiers in Immunology**. **Frontiers Media S.A.**, 3 jan. 2022.

MLCOCHOVA, P. *et al.* SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. **Nature**, v. 599, n. 7883, p. 114–119, 4 nov. 2021.

MOHAMED MMB, LUKITSCH I, TORRES-ORTIZ AE, WALKER JB, VARGHESE V, HERNANDEZ-ARROYO CF, ALQUDSI M, LEDOUX JR, VELEZ JCQ. Acute Kidney Injury Associated with Coronavirus Disease 2019 in Urban New Orleans. **Kidney360**. v.1, n.7, p. 614-622, may. 2020.

MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **International Journal of Surgery**, v. 8, n. 5, p. 336–341, 2010.

NAQVI, A. A. T. *et al.* Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, **Elsevier B.V.**, 1 out. 2020.

NAVECA, F. G. *et al.* COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1238, 1 jul. 2021.

NGUYEN-LEFEBVRE, A. T. *et al.* The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 11, p. 4870–4883, 1 nov. 2018.

NIKKHOO B, MOHAMMADI M, HASANI S, SIGARI N, BORHANI A, RAMEZANI C, CHARAJOO A, BADRI S, ROSTAMI F, ETEMADI M, RAHMANI K. Elevated interleukin (IL)-6 as a predictor of disease severity among Covid-19 patients: a prospective cohort study. **BMC Infect Dis.** v. 23, n. 1, p. 311, 2023.

NIQUINI, R. P. *et al.* SRAG por COVID-19 no Brasil: description and comparison of demographic characteristics and comorbidities in SARI from COVID-19, SARI from influenza, and the Brazilian general population. **Reports in Public Health**, v. 36, n. 7, 2020.

O'TOOLE, Á. *et al.* Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2. **Wellcome Open Research**, v. 6, 2021.

OU, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, 27 mar. 2020.

PARK, Y. *et al.* Contact Tracing during Coronavirus Disease Outbreak, South Korea, 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 10, p. 2465–2468, 1 out. 2020.

PILLAI RN, BEHERA M, OWONIKOKO TK, KAMPHORST AO, PAKKALA S, BELANI CP, KHURI FR, AHMED R, RAMALINGAM SS. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: A systematic analysis of the literature. **Cancer**, v.124, n.2, p. 271-277, 15 jan. 2018.

POLIDORO RB, HAGAN RS, DE SANTIS SANTIAGO R, SCHMIDT NW. Overview: Systemic Inflammatory Response Derived From Lung Injury Caused by SARS-CoV-2 Infection Explains Severe Outcomes in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1626, 26 jun. 2020.

POLONI JAT, JAHNKE VS, ROTTA LN Acute kidney injury in patients with COVID-19, **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.52, n. 2, p. 160-7, 2020.

PURBEY, P. K. *et al.* Mechanistic insight into the protective and pathogenic immune-responses against SARS-CoV-2. **Molecular Immunology**, v. 156, p. 111–126, abr. 2023.

\_\_\_\_. **Mechanistic insight into the protective and pathogenic immune-responses against SARS-CoV-2** *Molecular Immunology* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2023b.

QIN C, ZHOU L, HU Z, ZHANG S, YANG S, TAO Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. v. 71, n. 15, p. 762–8, Jul, 2020.

RAMBAUT, A. *et al.* A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 1 nov. 2020.

REMY K.E., BRAKENRIDGE S.C., FRANCOIS B., DAIX T., DEUTSCHMAN C.S., MONNERET G., JEANNET R., LATERRE P.-F., HOTCHKISS R.S., MOLDAWER L.L. Immunotherapies for COVID-19: lessons learned from sepsis. *Lancet Respir. Med*. v. 2, p. 2–5, 2020.

RIGO, I. *et al.* Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>. *Innate Immunity*, v. 18, n. 2, p. 250–257, abr. 2012.

ROHDE G, RADSACK MP, BORG I, et al. Levels of Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 in Infectious Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration*, v. 83, n. 2, p. 133–139, jan. 2012.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. **The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak** *Journal of Autoimmunity* Academic Press, 1 maio 2020. .

RYU, W.-S. Host Immune Response. *Em: Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. [s.l.] Elsevier, p. 63–82, 2017.

SABBATINO F, CONTI V, FRANCI G, et al. PD-L1 Dysregulation in COVID-19 Patients. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 695242, 2021.

SANTA CRUZ A, MENDES-FRIAS A, OLIVEIRA AI, DIAS L, MATOS AR, CARVALHO A, CAPELA C, PEDROSA J, CASTRO AG, SILVESTRE R. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 613422, 2021.

SCHOGGINS, J.W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do?. **Annual Review of Virology**, v.6, n. 1, p. 567-584, 29 sep. 2019.

SCHULTZE JL, ASCHENBRENNER AC. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**. v. 184, n. 7, p. 1671-1692, 2021..

SCRIMINI, S. *et al.* Expression of HLA-DR in circulating polymorphonuclear neutrophils of COPD patients, **European Respiratory Journal**, v. 42, 2013.

SHESHACHALAM, A. *et al.* Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. **Frontiers in Immunology**. **Frontiers Research Foundation**, set. 2014.

SINGANAYAGAM A, PATEL M, CHARLETT A, LOPEZ BERNAL J, SALIBA V, ELLIS J, LADHANI S, ZAMBON M, GOPAL R. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. **Euro Surveill**. v. 25, n. 32, p. 2001483, 2020.

SIMMONDS M. Quantifying the risk of error when interpreting funnel plots. **Systematic Reviews**, v. 4, p. 24, mar. 2015..

SKELLY, D. T. *et al.* Two doses of SARS-CoV-2 vaccination induce robust immune responses to emerging SARS-CoV-2 variants of concern. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021.

SOOD, A.; BEDI, O. Histopathological and molecular links of COVID-19 with novel clinical manifestations for the management of coronavirus-like complications. **Inflammopharmacology**, 30 maio 2022.

DE SOUZA ARAÚJO, A. A. *et al.* Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in the poorest region of Brazil: results from a population-based study. **Epidemiology and Infection**, v. 149, p. e130, 18 maio 2021.

SOUZA, W. M. DE *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856–865, 31 jul. 2020.

STAATS, J. *et al.* Guidelines for Gating Flow Cytometry Data for Immunological Assays. In: McCoy, Jr, J. (eds) Immunophenotyping. **Methods in Molecular Biology**, vol 2032. Humana, New York, NY p. 81–104, 2019.

STREICHER, F.; JOUVENET, N. Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 12, p. 1134–1148, dez. 2019.

SU L, LIU D, CHAI W, et al. Role of sTREM-1 in predicting mortality of infection: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, v. 6, n. 5, 14 abr. 2016.

SU H, YANG M, WAN C, YI LX, TANG F, ZHU HY, et al. Renal histopathological Analysis of 26 Postmortem Findings of Patients with COVID-19 in China. **Kidney International Reports**, v. 98, n. 1, p. 219-27, jul. 2020.

SUNGNACK, W. *et al.* SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 681–687, 23 maio 2020.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation Cell, **Elsevier B.V.**, 2010.

TAMMARO, A. *et al.* TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. **Pharmacology & therapeutics**, v. 177, p. 81–95, set. 2017.

TAN L, WANG Q, ZHANG D, DING J, HUANG Q, TANG YQ, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduct Target Ther**. v. 5, n. 1, p. 33, 2020.

TANG L, YIN Z, HU Y, MEI H. Controlling Cytokine Storm Is Vital in COVID-19. **Frontiers Immunology**, v. 11, 30 dez. 2020.

TANIGUCHI K., KARIN M. IL-6 e citocinas relacionadas como os pilares críticos entre inflamação e câncer. **Semin. Immunol.** v. 26, p. 54–74, 2014.

TEGALLY, H. *et al.* Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, 15 abr. 2021.

TOMAR, B. *et al.* Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1383, 2 jun. 2020.

VABRET, N. *et al.* **Immunology of COVID-19: Current State of the Science Immunity**, Cell Press, 16 jun. 2020.

VAN SINGER, M., BRAHIER, T., NGAI, M., et al. COVID-19 risk stratification

algorithms based on sTREM-1 and IL-6 in emergency department. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 1, p. 99-106.e4, jan. 2021.

VAN SINGER, M., BRAHIER, T., KOCH, J. *et al.* Validation of sTREM-1 and IL-6 based algorithms for outcome prediction of COVID-19. **BMC Infect Dis** v. 23, p. 630, 2023.

VERDECCHIA, P. *et al.* The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection *European Journal of Internal Medicine*, **Elsevier B.V.**, 1 jun. 2020.

VOLZ, E. *et al.* Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Nature**, v. 593, n. 7858, p. 266–269, 13 maio 2021.

WAN, X., WANG, W., LIU, J., TONG, T. Estimating the sample mean and standard deviation from the sample size, median, range and/or interquartile range. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, p. 135, 19 dez. 2014.

WANG D, *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**. v. 323, p. 1061–1069, 2020.

WANG, M. *et al.* SARS-CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1860–1865, dez. 2005.

WATSON OJ, BARNESLEY G, TOOR J, HOGAN AB, WINSKILL P, GHANI AC. Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. **Lancet Infect Dis**. v. 22, n. 9, p. 1293-1302, 2022.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Statement on the second meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-nCoV)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/news-room/detail/30-01-2020-statement-on-the-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-outbreak-of-novel-coronavirus-(2019-ncov))>. Acesso em: 6 jun. 2023.

\_\_\_\_\_. **Weekly epidemiological update on COVID-19**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---13-april-2023>>. Acesso em: 19 abr. 2023a.

\_\_\_\_. **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic.** Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 19 abr. 2023b.

WHO-2019-nCoV-IPC-2021.1-eng. [s.d.].

WHO Health Emergencies Programme, 2024. Disponível em: [COVID-19 cases | WHO COVID-19 dashboard](#) Acessado 28 de jun 2024.

WIERSINGA, W. J. *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782, 25 ago. 2020.

WILK, A. J. *et al.* A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1070–1076, 8 jul. 2020.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642–660, 20 fev. 2013.

WOODRUFF, M.C., *et al.* Chronic inflammation, neutrophil activity, and autoreactivity splits long COVID. **Nat Commun.** v. 14, n. 1, p. 4201, 2023.

WRIGHT, S.W., LOVELACE-MACON, L., HANTRAKUN, V., *et al.* sTREM-1 predicts mortality in hospitalized patients with infection in a tropical, middle-income country. **BMC Medicine**, v. 18, n. 159, 1 jul. 2020

WU, A. *et al.* **Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China** Cell Host and Microbe Cell Press, , 11 mar. 2020.

WULANDARI, S.; HARTONO; WIBAWA, T. The role of HMGB1 in COVID-19-induced cytokine storm and its potential therapeutic targets: A review. **Immunology**, v. 169, n. 2, p. 117–131, 11 jun. 2023.

XIA H, CAO Z, XIE X, ZHANG X, CHEN JY, WANG H, MENACHERY VD, RAJSBAUM R, SHI PY. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. **Cell Rep.** v. 33, n. 1, p. 108234, 2020.

XIE X, *et al.* An Infectious cDNA Clone of SARS-CoV-2. **Cell Host Microbe**. 2020 May 13, v. 27, n. 5, p. 841-848, 13 Abr. 2020.

XU, Z. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 1 abr. 2020.

XU G, *et al.* The differential immune responses to COVID-19 in peripheral and lung revealed by single-cell RNA sequencing. **Cell Discov.** v. 6, p. 73, 2020.

YANG, L., LIU, S., LIU, J., *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 128, 25 jul. 2020.

YAŞAR, Ş., ÇOLAK, C., YOLOĞLU, S. Artificial Intelligence-Based Prediction of Covid-19 Severity on the Results of Protein Profiling. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 202:105996, abr. 2021.

YE W, HU Y, ZHANG R, YING K. Diagnostic value of the soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in lower respiratory tract infections: A meta-analysis. **Respirology**, v. 19, p. 501–507, 24 mar. 2014.

YUAN, Y. *et al.* Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15092, 10 abr. 2017.

YOUNGS, J., PROVIN, N.M., LIM, N., *et al.* Identification of immune correlates of fatal outcomes in critically ill COVID-19 patients. **PLOS Pathogens**, v. 17:e1009804, 16 set. 2021.

YUAN, Z., SYED, M., PANCHAL, D., *et al.* TREM-1-accentuated lung injury via miR-155 is inhibited by LP17 nanomedicine. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, p. L426–L438, 1 mar. 2016.

ZAKI, A. M. *et al.* Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 8 nov. 2012.

ZEISER, F. A. *et al.* First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 6, p. 100107, fev. 2022.

ZHANG, J. Y. *et al.* Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19. **Nature Immunology**, v. 21, n. 9, p. 1107–1118, 1 set. 2020.

ZHONG, N. *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **The Lancet**, v. 362, n. 9393, p. 1353–1358, out. 2003.

ZHONG MF, ZHAO JM (2016) Diagnostic values of plasma CD64 and sTREM-1 for pediatric pneumonia. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 18:599–602.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020.

ZHOU, H. *et al.* Advances in Pathogenesis, Progression, Potential Targets and Targeted Therapeutic Strategies in SARS-CoV-2-Induced COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 5 abr. 2022.

ZHOU, Y. *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients, **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 998–1002, 1 jun. 2020b.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020a.

## ANEXO A - Estratégia de busca.

**Tabela Suplementar 1. Estratégias de busca.****Pubmed**


---

((Respiratory Tract Infections) OR (Infection, Respiratory Tract) OR (Respiratory Tract Infection) OR (Infections, Respiratory) OR (Infections, Respiratory Tract) OR (Respiratory Infections) OR (Respiratory Syncytial Virus, Human) OR (Human respiratory syncytial virus) OR (Human respiratory syncytial virus type A) OR (Human respiratory syncytial virus type B) OR (Pneumonia, viral) OR (Pneumonias, Viral) OR (Viral Pneumonia) OR (Viral Pneumonias) OR (Respiratory Distress Syndrome) OR (ARDS, Human) OR (Human ARDS) OR (Severe Acute Respiratory Syndrome) OR (Respiratory Syndrome, Severe Acute) OR (SARS) OR (Respiratory Syndrome, Acute, Severe) OR (SARS virus) OR (Severe Acute Respiratory Syndrome Virus) OR (SARS-Related Coronavirus) OR (Coronavirus, SARS-Related) OR (SARS Related Coronavirus) OR (SARS-CoV) OR (Urbani SARS-Associated Coronavirus) OR (Coronavirus, Urbani SARS-Associated) OR (SARS-Associated Coronavirus, Urbani) OR (Urbani SARS Associated Coronavirus) OR (SARS Coronavirus) OR (Coronavirus, SARS) OR (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) OR (Severe acute respiratory syndrome related coronavirus) OR (SARS-Associated Coronavirus) OR (Coronavirus, SARS-Associated) OR (SARS Associated Coronavirus) OR (SARS-CoV-2 variants) OR (Coronavirus Infections) OR (Coronavirus Infection) OR (Infection, Coronavirus) OR (Infections, Coronavirus) OR (Middle East Respiratory Syndrome) OR (MERS) OR (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) OR (Middle East respiratory syndrome related coronavirus) OR (MERS-CoV) OR (MERS Virus) OR (MERS Viruses) OR (Virus, MERS) OR (Viruses, MERS) OR (COVID-19) OR (COVID 19) OR (COVID-19 Virus Disease) OR (COVID 19 Virus Disease) OR (COVID-19 Virus Diseases) OR (Disease, COVID-19 Virus) OR (Virus Disease, COVID-19) OR (COVID-19 Virus Infection) OR (COVID 19 Virus Infection) OR (COVID-19 Virus Infections) OR (Infection, COVID-19 Virus) OR (Virus Infection, COVID-19) OR (2019-nCoV Infection) OR (2019 nCoV Infection) OR (2019-nCoV Infections) OR (Infection, 2019-nCoV) OR (Coronavirus Disease-19) OR (Coronavirus Disease 19) OR (2019 Novel Coronavirus Disease) OR (2019 Novel Coronavirus Infection) OR (2019-nCoV Disease) OR (2019

---

---

nCoV Disease) OR (2019-nCoV Diseases) OR (Disease, 2019-nCoV) OR (COVID19)  
 OR (Coronavirus Disease 2019) OR (Disease 2019, Coronavirus) OR (SARS-COV-2)  
 OR (SARS-COV-2 Virus) OR (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)  
 OR (SARS Coronavirus 2 Infection) OR (SARS-CoV-2 Infection) OR (Infection,  
 SARS-CoV-2) OR (SARS CoV 2 Infection) OR (SARS-CoV-2 Infections) OR  
 (COVID-19 Pandemic) OR (COVID 19 Pandemic) OR (COVID-19 Pandemics) OR  
 (Pandemic, COVID-19) OR (Coronavirus NL63, Human) OR (NL63, Human  
 Coronavirus) OR (HCoV-NL63) OR (Human Coronavirus NL63) OR (Coronavirus  
 229E, Human) OR (HCoV-229E) OR (Human Coronavirus 229E) OR (Coronavirus  
 OC43, Human) OR (HCoV-OC43) OR (Human Coronavirus OC43) OR (Influenza,  
 Human) OR (Human Influenzas) OR (Influenzas, Human) OR (Influenza) OR  
 (Influenza A) OR (Influenza A H5N5) OR (Influenza A H1N1) OR (Influenza B) OR  
 (orthomyxoviridae) OR (Influenzas) OR (Human Flu) OR (Flu, Human) OR (Human  
 Influenza) OR (Influenza in Humans) OR (Influenza in Human) OR (Grippe) OR  
 (Paramyxoviridae Infections) OR (Infections, Paramyxoviridae) OR (Infection,  
 Paramyxoviridae) OR (Infection, Paramyxoviridae) OR (Paramyxoviridae Infection)  
 OR (Parainfluenza Virus Infections) OR (Infection, Parainfluenza Virus) OR  
 (Infections, Parainfluenza Virus) OR (Parainfluenza Virus Infection) OR (Virus  
 Infection, Parainfluenza) OR (Virus Infections, Parainfluenza) OR (Parainfluenza) OR  
 (Parainfluenza virus type 1) OR (Parainfluenza virus type 2) OR (Parainfluenza virus  
 type 3) OR (Parainfluenza virus type 4) OR (Adenoviridae Infections) OR (Adenovirus  
 Infections) OR (Infections, Adenoviridae) OR (Adenoviridae Infection) OR (Infection,  
 Adenoviridae) OR (Infections, Adenovirus ) OR (Adenovirus Infection) OR (Infection,  
 Adenovirus) OR (Metapneumovirus) OR (Metapneumoviruses) OR  
 (Metapneumovirus, Human) OR (Human Metapneumoviruses) OR  
 (Metapneumoviruses, Human) OR (Human Metapneumovirus) OR (Bronchitis) OR  
 (Bronchitides) OR (Bronchiolitis, Viral) OR (Bronchiolitides, Viral) OR (Viral  
 Bronchiolitides) OR (Viral Bronchiolitis) OR (Rhinovirus) OR (Rhinoviruses) OR  
 (Common Cold Virus) OR (Cold Virus, Common) OR (Cold Viruses, Common) OR  
 (Common Cold Viruses) OR (Coryza Viruses) OR (Coryza Virus) OR (Bocavirus) OR  
 (Bocaviruses) OR (Parechovirus) OR (Parechoviruses)) AND ((Triggering Receptor  
 Expressed on Myeloid Cells 1) OR (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-  
 1) OR (TREM-1 Protein) OR (TREM 1 Protein) OR (TREM-1) OR (CD354 Antigen)

---

---

OR (Antigen, CD354) OR (sTREM-1) OR (sTREM 1) OR (Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1) OR (Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1))

---

### **Scopus**

---

TITLE-ABS-KEY("triggering receptor expressed on myeloid cells-1" OR "triggering receptor expressed on myeloid cells 1" OR "trem-1" AND "viral respiratory tract infection" OR "human respiratory syncytial virus" OR "virus pneumonia" OR "acute respiratory distress syndrome" OR "severe acute respiratory syndrome" OR "coronavirus infection" OR "coronavirus disease 2019" OR "covid-19" OR "influenza virus" OR "paramyxovirus infection" OR "human parainfluenza virus 1" OR "human parainfluenza virus 2" OR "human parainfluenza virus 3" OR "human parainfluenza virus 4" OR "adenovirus infection" OR "human metapneumovirus" OR "viral bronchiolitis" OR "human rhinovirus" OR "bocavirus infection" OR "human parechovirus")

---

### **Embase**

---

("triggering receptor expressed on myeloid cells 1" OR "TREM-1") AND ("viral respiratory tract infection" OR "Human respiratory syncytial virus" OR "virus pneumonia" OR "adult respiratory distress syndrome" OR "severe acute respiratory syndrome" OR "Coronavirus infection" OR "coronavirus disease 2019" OR "COVID-19" OR "Influenza virus" OR "paramyxovirus infection" OR "Human parainfluenza virus 1" OR "Human parainfluenza virus 2" OR "Human parainfluenza virus 3" OR "Human parainfluenza virus 4" OR "adenovirus infection" OR "Human metapneumovirus" OR "viral bronchiolitis" OR "Human rhinovirus" OR "Bocavirus infection" OR "Human parechovirus")

---



## Role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) in COVID-19 and other viral pneumonias: a systematic review and meta-analysis of clinical studies

Yrna Lorena Matos de Oliveira<sup>1</sup> · Ayane de Sá Resende<sup>1</sup> · Paulo Ricardo Martins-Filho<sup>1,2,3</sup> · Tatiana Rodrigues de Moura<sup>1</sup>

Received: 13 February 2022 / Accepted: 5 March 2022 / Published online: 28 March 2022  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

### Abstract

**Background** Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) has emerged as an important inflammatory marker of immune response associated with severity and mortality outcomes in infection diseases, including viral pneumonias.

**Aim** (1) To evaluate the expression of TREM-1 in patients with COVID-19 and other viral pneumonias compared to healthy individuals; and (2) to analyze the levels of these biomarkers according to disease severity.

**Materials and methods** This review was conducted according to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guideline. Searches were performed in PubMed, Scopus, Embase, and Google Scholar. Studies were considered eligible if they were observational studies that provided data on the levels of TREM-1 in humans with viral pneumonia compared to healthy controls. The results of the meta-analysis were expressed as standardized mean difference (SMD) and an effect size of 0.8 was considered a large effect. A subgroup analysis was performed according to the disease severity.

**Results** Seven studies were included in this systematic review. Four studies included patients with COVID-19 and three analyzed patients with different viruses. The meta-analysis was performed only with patients with COVID-19, which showed increased levels of soluble form of TREM-1 (sTREM-1) among patients with COVID-19 compared to healthy controls (SMD 1.53; 95% CI 0.53–2.52;  $p < 0.01$ ). No differences were found between patients with mild-to-moderate COVID-19 and healthy controls, but higher levels of sTREM-1 were shown among patients with severe COVID-19 (SMD 1.83; 95% CI 0.77–2.88;  $p < 0.01$ ). All three studies including patients with other viral pneumonias showed that TREM-1 levels were significantly elevated in infected patients compared with controls.

**Conclusion** These findings may provide evidence on the pro-inflammatory role of TREM-1 in these infections, contributing to the inflammatory profile and disease progression.

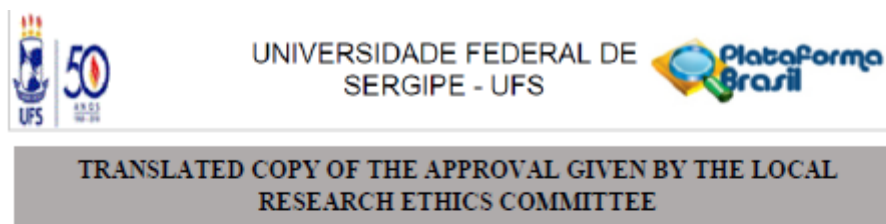
**Keywords** Viral infections · Coronavirus disease-2019 · COVID-19 · SARS-CoV-2 · Viral pneumonia · TREM-1

ANEXO C – Tabela de avaliação do risco de viés. Legenda: \*CD, não pode determinar;

N, não; NA, não aplicável; NR, não reportado; Y, sim.

| Questões                                                                                                                                                                                                                                                                                         | De Nooijer et al. 2021 | Kerget et al. 2021 | Yasar et al. 2021 | Youngs et al. 2021 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <b>1. A questão de investigação ou o objetivo deste trabalho foram claramente definidos?</b>                                                                                                                                                                                                     | Y                      | Y                  | Y                 | Y                  |
| <b>2. A população do estudo foi claramente especificada e definida?</b>                                                                                                                                                                                                                          | Y                      | Y                  | N                 | N                  |
| <b>3. A taxa de participação das pessoas elegíveis foi de, pelo menos, 50%?</b>                                                                                                                                                                                                                  | CD                     | CD                 | CD                | CD                 |
| <b>4. Todos os sujeitos foram seleccionados ou recrutados nas mesmas populações ou em populações semelhantes (incluindo o mesmo período de tempo)? Os critérios de inclusão e exclusão para participar no estudo foram pré-especificados e aplicados uniformemente a todos os participantes?</b> | N                      | Y                  | N                 | N                  |
| <b>5. Foi fornecida uma justificação do tamanho da amostra, uma descrição do poder ou estimativas da variância e do efeito?</b>                                                                                                                                                                  | N                      | N                  | N                 | N                  |
| <b>6. Para as análises deste documento, a(s) exposição(ões) de interesse foram medidas antes do(s) resultado(s) ser(em) medido(s)?</b>                                                                                                                                                           | NA                     | NA                 | NA                | NA                 |
| <b>7. O período de tempo foi suficiente para que se pudesse razoavelmente esperar ver uma associação entre a exposição e o resultado, caso existisse?</b>                                                                                                                                        | NA                     | NA                 | NA                | NA                 |
| <b>8. No caso de exposições que podem variar em quantidade ou nível, o estudo examinou diferentes níveis de exposição em relação ao resultado (por exemplo, categorias de exposição ou exposição medida como variável contínua)?</b>                                                             | N                      | Y                  | Y                 | N                  |
| <b>9. As medidas de exposição (variáveis independentes) foram claramente definidas, válidas, fiáveis e implementadas de forma consistente em todos os participantes no estudo?</b>                                                                                                               | Y                      | Y                  | Y                 | Y                  |
| <b>10. A(s) exposição(ões) foi(ram) avaliada(s) mais do que uma vez ao longo do tempo?</b>                                                                                                                                                                                                       | NA                     | NA                 | NA                | NA                 |
| <b>11. As medidas de resultados (variáveis dependentes) foram claramente definidas, válidas, fiáveis e implementadas de forma consistente em todos os participantes no estudo?</b>                                                                                                               | Y                      | Y                  | Y                 | Y                  |
| <b>12. Os avaliadores dos resultados não tinham conhecimento do estado de exposição dos participantes?</b>                                                                                                                                                                                       | CD                     | CD                 | CD                | CD                 |
| <b>13. A perda de seguimento após a linha de base foi igual ou inferior a 20%?</b>                                                                                                                                                                                                               | NA                     | NA                 | NA                | NA                 |
| <b>14. As principais variáveis de confusão potenciais foram medidas e ajustadas estatisticamente quanto ao seu impacto na relação entre a(s) exposição(ões) e o(s) resultado(s)?</b>                                                                                                             | N                      | N                  | N                 | Y                  |

## ANEXO D – Aprovação do Comitê de Ética

**RESEARCH PROJECT DATA**

**Title:** Identification of severity predictors in COVID-19

**Researcher:** Tatiana Rodrigues de Moura

**Thematic area:** -

**Version:** 3

**Accession number (CAAE):** 34240620.7.0000.5546

**Applicant institution:** Federal University of Sergipe Foundation

**Project sponsor:** Personal Financing

**APPROVAL DATA**

**Accession number of the approval:** 5.160.550

**Report date:** 25/06/2015

**Project presentation:**

This is the 3rd Project report.

The project presentation, composed by introduction and proposed methods, was documented in previous reports.

**Research Purposes:**

**Main objective:**

## ANEXO E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR.

Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório

CEP: 49060-100 Aracaju/SE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar e contribuir no desenvolvimento do seguinte projeto de pesquisa: **Identificação de preditores de gravidade na COVID-19.**

Prezado (a),

Este documento explica sobre os seus direitos, objetivos da pesquisa, benefícios e riscos de participar nesta pesquisa. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode tirar dúvidas sobre a pesquisa com seu médico. Caso você compreenda e concorde em participar desta pesquisa, você será solicitado a assinar com letra legível este consentimento nos campos existentes ao final deste documento.

**Justificativa e Objetivo da Pesquisa:** Estamos enfrentando um momento difícil com a epidemia da Covid-19, a qual é uma doença causada por um vírus chamado Sars-Cov-2. Portanto, nossa pesquisa tem como objetivo principal avaliar a resposta das células de defesa do nosso organismo, assim como, identificar moléculas que possam contribuir no melhor diagnóstico e prognóstico desta doença Covid-19. Pretendemos nesse estudo compreender como e por que a doença evolui para casos graves de maior severidade e avaliar possíveis alterações no seu sangue e nas fezes que podem estar favorecendo esse avanço para casos mais severos. Os nossos futuros resultados desta pesquisa podem contribuir para o um melhor entendimento e controle desta doença,

desenvolvimento de medicamentos, bem como abrir caminhos para novas abordagens de prevenção e tratamento da doença e de futuras epidemias.

**Procedimentos:** Caso você aceite participar do estudo, você doará sangue e amostras de fezes para serem utilizados em nossas análises em laboratório. Sua participação acontecerá da seguinte forma: **HOJE** é o dia 1 e precisaremos fazer a primeira coleta de sangue e de fezes; **em 60 dias** entraremos em contato com você novamente para fazer a segunda coleta de sangue. Nestes dois encontros, precisaremos de algumas informações suas acerca dos sintomas que você está sentindo, uso de medicamentos e sobre seu estado de saúde para nosso estudo. Vale salientar que a sua participação nesta pesquisa não impede você de participar de outra pesquisa. E você receberá todo o suporte e tratamento adequado como já aconteceria independentemente desta pesquisa.

**Análise de riscos e benefícios:** A retirada de sangue é um procedimento de baixo risco que, contudo, pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do Hospital cuidarão de você. Ademais, esta pesquisa não oferece qualquer outro risco à sua saúde.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros pesquisadores e membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Os resultados obtidos neste estudo serão utilizados para publicação em revistas científicas nacionais e internacionais e para fins acadêmicos. O seu nome ou qualquer outro dado pessoal não será divulgado, pois em nossa pesquisa utilizamos códigos para identificar os sujeitos participantes da pesquisa com o objetivo de manter esta confidencialidade. Solicitamos também o seu consentimento para te ligar por telefone em algum momento ao longo destes próximos 60 dias para obter mais informações sobre o seu estado de saúde.

**Participação:** Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Se você decidir NÃO participar ou deixar de participar em algum momento, isso não resultará em penalidade, não afetará seu relacionamento com qualquer profissional da saúde, hospital, nem com seus cuidados de saúde atuais ou futuros. Caso você decida participar, você deverá assinar

este **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** confirmando que você recebeu as explicações sobre o propósito, a duração e os efeitos previstos do estudo, e que você forneceu o seu consentimento para participar desse estudo.

**Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade:** O melhor conhecimento sobre a COVID-19 poderá contribuir para medidas de controle, prevenção e tratamento desta doença que vem acometendo milhões de pessoas em todo o mundo.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa.

**Esclarecimentos:** Você receberá uma cópia deste documento e poderá solicitar mais informações a qualquer momento durante o estudo entrando em contato com os pesquisadores. Você poderá ainda entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital HU-UFS, pelo telefone (79) 2105 6510 / 6511 na Rua Cláudio Batista, bairro Santo Antônio- Aracaju/ SE, se você tiver qualquer dúvida com relação aos seus direitos como participante de um estudo de pesquisa. O Comitê de ética é o responsável por controlar a pesquisa para que os estudos clínicos sejam realizados dentro do maior rigor ético, garantindo assim, a qualidade dos resultados e a segurança dos pacientes. Abaixo são os contatos das pesquisadoras responsáveis por este estudo:

**Msc. Yrna Lorena Matos de Oliveira (aluna de doutorado)**

Telefone: (79)99810-5146 E-mail: yrna.lore@gmail.com

**Msc. Ayane de Sá Resende (aluna de doutorado)**

Telefone: (79) 991716162 E-mail ayane.s.resende@gmail.com

**Dra. Tatiana Rodrigues de Moura (orientadora responsável pela pesquisa)**

Telefone: (79) 98837-8130 E-mail tmoura.ufs@gmail.com

Instituição a que pertence as pesquisadoras: **Universidade Federal de Sergipe / Hospital Universitário-Aracaju/SE**

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor preencher e assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue.

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_ declaro ter sido informado (a) e concordo em  
participar, como voluntário (a), do projeto de pesquisa acima descrito. Estou ciente que:

I – Tenho liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo, no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

II – A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico;

III – Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

|                                         |       |       |
|-----------------------------------------|-------|-------|
| _____                                   | _____ | _____ |
| Assinatura ou impressão do participante | Data  | Hora  |
| _____                                   | _____ | _____ |
| Nome/Assinatura do pesquisador          | Data  | Hora  |

Código de Ética Médica – Art. 22. É vedado ao médico deixar de obter consentimento do paciente ou de seu representante legal após esclarecê-lo sobre o procedimento a ser realizado, salvo em caso de risco iminente de morte. Art. 34. É vedado ao médico deixar de informar ao paciente o diagnóstico, o prognóstico, os riscos e os objetivos do tratamento, salvo quando a comunicação direta possa lhe provocar dano, devendo, nesse caso, fazer a comunicação a seu representante legal.

**SUA PARTICIPAÇÃO É MUITO IMPORTANTE!**