



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO
AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
HEMATOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO GENE DO
RECEPTOR TREM-1 NO PERFIL DE CITOCINAS E OUTROS MEDIADORES
SOLÚVEIS EM INDIVÍDUOS CONVALESCENTES E DE FASE AGUDA DA
COVID-19**

WIVIAN DA CONCEIÇÃO COSTA DA SILVA

**MANAUS
2023**

WIVIAN DA CONCEIÇÃO COSTA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO GENE DO
RECEPTOR TREM-1 NO PERFIL DE CITOCINAS E OUTROS MEDIADORES
SOLÚVEIS EM INDIVÍDUOS CONVALESCENTES E DE FASE AGUDA DA
COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientador (a): Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Coorientador (a): Profa. Dra. Andréa Monteiro Tarragô

**MANAUS
2023**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586ii Silva, Wivian da Conceição Costa da, Wivian da Conceição Costa da Silva

Influência de variantes genéticas associadas ao gene do receptor TREM-1 no perfil de citocinas e outros mediadores solúveis em indivíduos convalescentes e de fase aguda da COVID-19 / Wivian da Conceição Costa da Silva. Silva, Wivian da Conceição Costa da. Manaus : [s.n], 2023.

98 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Marie, Adriana Malheiro Alle

Coorientador: Tarragô, Andréa Monteiro

1. COVID-19. 2. TREM-1. 3. Inflamação. 4. sTREM-1. 5. Plasma Convalescente. I. Marie, Adriana Malheiro Alle (Orient.). II. Tarragô, Andréa Monteiro (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Influência de variantes genéticas associadas ao gene do receptor TREM-1 no perfil de citocinas e outros mediadores solúveis em indivíduos convalescentes e de fase aguda da COVID-19



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 010/2023

Ao vigésimo terceiro dia do mês de agosto do ano de 2023, às 09h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação da discente **Wivian da Conceição Costa da Silva**, sob o título: **“Influência de variantes genéticas associadas ao gene do receptor TREM-1 no perfil de citocinas e outros mediadores solúveis em indivíduos convalescentes e de fase aguda da COVID 19”**, tendo como orientadora a Prof.^a Dr.^a **Adriana Malheiro Alle Marie** e coorientadora a Prof.^a Dr.^a **Andréa Monteiro Tarragô**, segundo encaminhamento da Prof.^a Dr.^a Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. ^a Dr. ^a Adriana Malheiro Alle Marie – Presidente (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: gov.br ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE Data: 24/08/2023 18:18:05-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes – Membro (INPA)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: gov.br GEMILSON SOARES PONTES Data: 25/08/2023 09:37:37-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. ^a Dr. ^a Aya Sadahiro – Membro (UFAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Assinatura: gov.br AYA SADAHIRO Data: 25/08/2023 07:55:46-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

(x) Aprovado () Não Aprovado

Documento assinado digitalmente
gov.br
ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE
Data: 24/08/2023 18:16:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM

- Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada
- Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123
- E-mail: mestrado@hemoam.am.gov.br
- Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>
- www.instagram.com/ppgh_uea



DEDICATÓRIA

Dedico inteiramente o sucesso deste trabalho ao meu maior orientador, DEUS. Dedico esta pesquisa a Ele, pois sem Ele, nada sou.

AGRADECIMENTOS

A DEUS

Agradeço profundamente aos meus pais, Tânia Lúcia e Paulo Lira, que batalharam muito para me oferecer uma educação de qualidade, e apesar de todas as dificuldades, sempre acreditaram no meu potencial e nunca negaram uma palavra de incentivo. Obrigada pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida!

Aos meus irmãos e sobrinhos, por trazerem leveza e alegria aos meus dias. Que Deus abençoe a cada um de vocês!

Aos meus tios, primos, avós e demais familiares, por todo amor, carinho e suporte.

A minha orientadora Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, pela oportunidade, pela confiança e por me acolher em seu grupo de pesquisa. Agradeço pela paciência e conhecimentos transmitidos.

A minha Coorientadora Dra. Andréa Monteiro Tarragô, pela paciência e pela oportunidade concedida. Agradeço por me ajudar a desenvolver este trabalho.

As minhas primeiras orientadoras Diana Mota Toro e Rechfy Kasem Abou Ali, que me ajudaram a iniciar na carreira científica.

Aos Doutores Carlos Sorgi e Lucia Faccioli, por me permitirem realizar os experimentos em seus laboratórios e por todo suporte concedido.

A equipe do projeto de pesquisa, que trabalha arduamente para desenvolver este trabalho importante.

As minhas amigas de turma Geyse, Naamy e Iandara, por serem luz nos momentos mais difíceis dessa jornada.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, por ser onde tudo iniciou desde o PAIC até aqui, e ao Hospital Universitário Getúlio Vargas por colaborar com todo o projeto.

Ao PPGH, a UEA, a turma 10/2021 do mestrado e aos professores, por todo conhecimento transmitido.

A FAPEAM, CAPES e CNPq por todo apoio financeiro.

Aos participantes deste estudo, agradeço muito pela disponibilidade em participar do projeto.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar indiretamente esta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo.

EPÍGRAFE

...Nenhum se susterá diante de ti, todos os dias da tua vida: como fui com Moisés, assim serei contigo: não te deixarei nem te desampararei.

Esforça-te, e tem bom ânimo: porque tu farás a este povo herdar a terra que jurei a seus pais lhe daria

Josué 1:5-6

...Bendito seja o Deus de Sadraque, Mesaque e Abdenengo, que enviou o seu anjo, e livrou os seus servos, que confiaram nele, pois não quiseram cumprir a palavra do rei, preferindo entregar os seus corpos, para que não servissem nem adorassem algum outro deus, senão o seu Deus;

Daniel 3:28

RESUMO

A COVID-19 tem sido amplamente estudada, visando a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica após infecção, dessa forma, apresentamos o Receptor Desencadeante Expresso em Células Mieloides 1 (TREM-1), que é regulado positivamente na inflamação e integra uma extensa família de receptores de imunoglobulinas (Ig) descoberto nos anos 2000. A ativação de TREM-1 potencializa a inflamação, e algumas variantes genéticas no gene *TREMI* têm sido associadas com o pior prognóstico em algumas doenças. Assim, avaliamos a frequência variantes no gene do receptor TREM-1 e as concentrações dos mediadores solúveis nos indivíduos com COVID-19 e nos indivíduos convalescentes da infecção. **Metodologia:** As variantes rs2234237 e rs2234246 foram genotipados por qPCR em 138 participantes. A dosagem de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , foi realizada por Luminex. A dosagem de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2 foi realizada por ELISA. **Resultados:** O alelo T da variante rs2234237 principalmente em homozigotos, e genótipo C/T da variante rs22342346, contribuem para o aumento de mediadores imunológicos na população de estudo. Pacientes com COVID-19, sobretudo com a forma grave, com comorbidades e que vieram a óbito apresentaram concentrações elevadas no soro/plasma de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Convalescentes da COVID-19 apresentaram declínio nas concentrações desses mediadores 30 dias após a cura clínica da infecção por SARS-CoV-2. **Conclusão:** O alelo T da variante rs2234237 foi o mais frequente na população de estudo, principalmente em homozigose. O genótipo C/T da variante rs2234246 foi o mais frequente no grupo controle e no grupo de pacientes com COVID-19, no entanto, o alelo C foi mais frequente no grupo com COVID-19 e o alelo T foi o mais frequente no grupo controle. Pacientes com COVID-19 apresentaram altas concentrações de mediadores imunológicos, principalmente aqueles com a forma grave, que apresentaram comorbidades e que vieram a óbito. Nos convalescentes, as concentrações de mediadores imunológicos foram significativamente diminuídas em todos os tempos de acompanhamento, sobretudo os níveis de CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α . Este é o primeiro estudo a investigar a relação entre TREM-1 e COVID-19 na Amazônia Brasileira. Os resultados deste estudo poderão contribuir para a identificação e determinação da participação efetiva do receptor TREM-1 na dinâmica da resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; variantes; TREM-1; plasma convalescente; SARS-COV-2; inflamação.

ABSTRACT

COVID-19 has been widely studied, aiming to better understand the mechanisms involved in the immune response after infection. Therefore, we present the Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells 1 (TREM-1), which is positively regulated in inflammation and integrates an extensive family of immunoglobulin (Ig) receptors discovered in the 2000s. Activation of TREM-1 potentiates inflammation, and some genetic variants in the TREM1 gene have been associated with a worse prognosis in some diseases. Therefore, we evaluated the frequency of variants in the TREM-1 receptor gene and the concentrations of soluble mediators in individuals with COVID-19 and in individuals convalescent from the infection.

Methodology: Variants rs2234237 and rs2234246 were genotyped by qPCR in 138 participants. The measurement of CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ was performed by Luminex. The measurement of sTREM-1, MMP-8 and MMP-2 was performed by ELISA. **Results:** The T allele of the rs2234237 variant, mainly in homozygotes, and the C/T genotype of the rs22342346 variant, contribute to the increase in immunological mediators in the study population. Patients with COVID-19, especially the severe form, with comorbidities and who died, presented high serum/plasma concentrations of CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ . Convalescents from COVID-19 showed a decline in the concentrations of these mediators 30 days after clinical cure of SARS-CoV-2 infection. **Conclusion:** The T allele of the rs2234237 variant was the most frequent in the study population, especially in homozygosity. The C/T genotype of the rs2234246 variant was the most frequent in the control group and in the group of patients with COVID-19, however, the C allele was more frequent in the group with COVID-19 and the T allele was the most frequent in the group control. Patients with COVID-19 presented high concentrations of immunological mediators, especially those with the severe form, who had comorbidities and who died. In convalescents, the concentrations of immunological mediators were significantly reduced at all follow-up times, especially the levels of CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α . This is the first study to investigate the relationship between TREM-1 and COVID-19 in the Brazilian Amazon. The results of this study may contribute to the identification and determination of the effective participation of the TREM-1 receptor in the dynamics of the immunological response to SARS-CoV-2 infection.

Keywords: COVID-19; variants; TREM-1; convalescent plasma; SARS-COV-2; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do SARS-CoV-2.....	25
Figura 2. Genoma do SARS-COV-2.....	26
Figura 3. Representação gráfica da replicação do SARS-CoV-2 na célula infectada.....	27
Figura 4. Representação esquemática das duas hipóteses de origem do sTREM-1.....	33
Figura 5. Possível mecanismo de ação do receptor TREM-1 e das metaloproteinases na resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2.....	35
Figura 6. Representação Esquemática da estrutura das metaloproteinases de matriz.....	37
Figura 7. Desenho do estudo e flowchart. Foram incluídos 138 participantes para genotipagem e dosagem de alguns mediadores imunológicos.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das variantes, localização do genoma e sondas.....	46
------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLO

SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
NLR	Receptores semelhantes a NOD
TLR	Receptores semelhantes a Toll
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
TREM-1	Receptor desencadeante expresso em células mielóides 1
TLT1	Transcritos tipo TREM-1
TLT2	Transcritos tipo TREM-2
TLT3	Transcritos tipo TREM-3
TLT4	Transcritos tipo TREM-4
TLT5	Transcritos tipo TREM-5
OMS	Organização Mundial de Saúde
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
MERS-COV	Síndrome Respiratória do Oriente Medio causada pelo Coronavirus MERS

SARS-COV	Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
ORF	Região Aberta de Leitura/Open Reading Frame
ACE2	do inglês, Angiotensin Converting Enzyme 2
TMPRSS2	Protease Serina Transmembrana 2
RBD	Dominio de Ligação ao Receptor
RTC	Complexo de Replicação e Transcrição
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - α
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MIP-α	Proteína inflamatória de macrófagos - alfa
IP-10	Proteína induzível por interferon 10
DAP12	Proteína de Ativação 12
LPS	Lipopolissacarídeo

HSP70	Proteínas de choque térmico de 70 quilodalton
HMGB-1	Proteína Caixa 1 do Grupo de Alta Mobilidade
ITAM	Motivo de Ativação Baseado em Receptor de Imunotirosina
SYK	Tirosina proteinase quinase
ZAP70	Proteína de 70kD Associada à Cadeia Zeta
GRB2	Proteína 2 Ligada ao Receptor do Fator de Crescimento
PI3K	Fosfatidilinositol quinase 3
ERK1	Proteína Quinase 1 Regulada por Sinal Extracelular
ERK2	Proteína Quinase 1 Regulada por Sinal Extracelular
MAP	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
ELK1	Proteína ETS tipo - 1
NFAT	Fator Nuclear de células T ativadas
CCL2	Ligante de Quimiocina 2
CCL7	Ligante de Quimiocina 7
IRAK-M	Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1
UTR	Região Não Traduzida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
SNV	Variante de Nucleotídeo Único

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	COVID-19: aspectos gerais	21
2.1.1	Epidemiologia e diagnóstico	22
2.1.2	Estrutura viral e organização genômica do SARS-CoV-2	25
2.1.3	Replicação e transmissão do SARS-CoV-2	26
2.1.4	Características clínicas da COVID-19 e resposta imunológica	28
2.1.5	Plasma convalescente	31
2.2	Gene <i>TREMI</i>	32
2.2.1	Sinalização TREM-1/DAP12	33
2.3	Metaloproteinases	35
2.3.1	Variantes do gene <i>TREMI</i>	38
3	OBJETIVO	40
3.1	Geral	40
3.2	Específicos	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Tipo de estudo	41
4.2	Aspectos éticos	41
4.3	Fluxograma de atividades	42
4.4	População de estudo e amostragem	43
4.5	Critérios de inclusão e exclusão	43
4.6	Critérios de não-inclusão	44
4.7	Critérios de exclusão	45
4.8	Coleta de dados	45
4.9	Extração de DNA	45
4.10	Genotipagem	46
4.11	Dosagem e quantificação de citocinas por Luminex	46
4.12	Dosagem e quantificação de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2 por ELISA	47
4.13	Análises estatísticas	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6	“INFLUÊNCIA DE VARIANTES NO GENE DO RECEPTOR TREM-1 NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À COVID-19”	48
7	CONCLUSÃO	83
8	REFERÊNCIAS	84
9	APÊNDICES	93

9.1	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93
9.2	Parecer Consubienciado do CEP.....	97

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma infecção que afeta inicialmente o trato respiratório, causada pela infecção pelo vírus SARS-CoV-2, capaz de causar um amplo espectro de manifestações clínicas em pacientes acometidos da doença. Complicações como pneumonia, síndrome da angústia respiratória aguda (SDRA), lesões no fígado, coração e rins, bem como o surgimento de infecções secundárias que ocasionalmente podem levar a falência múltipla de órgãos, têm sido frequentemente associadas a um prognóstico desfavorável da doença. ¹

Ao longo da pandemia, a identificação de terapias capazes de mitigar o efeito da doença e melhorar o manejo clínico de pacientes com COVID-19, tem sido desafiadora. Contudo, o uso de plasma convalescente, terapias experimentais, o uso de fitoterápicos e diversas outras abordagens terapêuticas, foram usadas com o intuito de atuarem nos distintos estágios da infecção e fortalecer a resposta imunológica. ^{2,3}

Dessa forma, uma resposta imune antiviral efetiva do hospedeiro, deve envolver mecanismos da imunidade inata e adaptativa, incluindo a síntese de diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, e recrutamento de macrófagos e granulócitos pró-inflamatórios. A ativação de células T CD4⁺, T CD8⁺ e células B, são essenciais para controlar a replicação viral, limitando a disseminação do vírus, eliminação das células infectadas e regulação de danos teciduais. ^{4,5}

Em virtude disso, a relação entre a resposta imunológica e a infecção pelo SARS-CoV-2 tem sido amplamente estudada, objetivando a compreensão dos mecanismos imunológicos na COVID-19, tal como algumas características relacionadas a imunidade, que têm sido apontadas como potenciais alvos terapêuticos ou biomarcadores, que possam contribuir para um bom desfecho clínico da doença, ou auxiliar no manejo dos pacientes. ⁶

Desse modo, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores Toll (TLRs) e os NOD (NLRs), estão presentes na membrana de diferentes tipos celulares, e reconhecem uma ampla variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Estes são capazes de desencadear sinalizações que resultam em ativação de fatores de transcrição, que regulam de forma positiva a expressão de diversos genes da resposta imune, amplificando o processo inflamatório podendo levar a danos locais ou sistêmicos. ^{4,5}

Dentre os receptores, que medeiam ou regulam a resposta imune, destacamos o receptor desencadeante expresso em células mieloides 1 (TREM-1), que é regulado positivamente na inflamação e integra uma extensa família de receptores de imunoglobulinas (Ig) descoberto nos

anos 2000. Sabe-se que a ativação do TREM-1 desencadeia e potencializa a inflamação, sendo que alguns polimorfismos nesse receptor têm sido estudados e associados com o pior prognóstico de algumas doenças. No entanto, o papel desse receptor na resposta imunológica da COVID-19 e seu papel na modulação da resposta imune nessa doença, assim como sua associação com polimorfismos nos genes desse receptor na população do Amazonas, ainda não estão bem estabelecidos. Dessa forma, propomos estudar os polimorfismos dos genes *TREM1* e sua associação com resposta imune em pacientes convalescentes e agudos da COVID-19.^{7,8}

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COVID-19: aspectos gerais

Em dezembro de 2019, uma infecção respiratória de etiologia desconhecida, surgiu na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China. O microrganismo causador dos quadros de pneumonia atípica foi identificado por sequenciamento molecular em 10 de janeiro de 2020, e foi constatado que se tratava de um coronavírus nunca visto anteriormente.⁹⁻¹¹

Inicialmente o agente etiológico causador da doença foi denominado 2019-nCov, e posteriormente nomeado como Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus-2 (SARS-CoV-2), pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus [International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)] e a Organização Mundial da Saúde (OMS). A doença se espalhou de forma muito rápida, de modo que, em poucos dias vários casos foram identificados ao longo das 34 províncias de Hubei, na China.⁹⁻¹¹

Em virtude disso, a OMS declarou um surto de infecções causadas pelo SARS-CoV-2 em 30 de janeiro de 2020, e posteriormente foi declarada a COVID-19 (Coronavírus Disease 2019) como o nome da doença. A disseminação da COVID-19 se deu de tal maneira que, em 11 de março de 2020 a OMS declarou o surto da doença como uma pandemia, e desde então medidas sanitárias como uso de máscara e distanciamento social foram adotadas mundialmente, visando desacelerar o aumento acentuado de casos da COVID-19.^{12,13}

Sabidamente, duas espécies de CoVs são capazes de causar Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) com pior prognóstico, ambas causadas por dois tipos distintos de coronavírus já descritos anteriormente. Ambos, SARS-CoV e MERS-CoV, levaram a surtos na China e no Oriente Médio em 2002 e 2012, respectivamente. No entanto, tratava-se de uma nova cepa de coronavírus que até então ainda não havia sido descrita em seres humanos, e que é filogeneticamente é homóloga ao SARS-CoV.^{11,14}

Inicialmente, o SARS-CoV-2 infecta as células epiteliais das vias aéreas e alveolares, células endoteliais vasculares e macrófagos alveolares, que são células comuns do trato respiratório e expressam grandes quantidades de ACE2. De acordo com o Ministério da Saúde², o período médio de incubação da doença é de 5 a 6 dias.^{1,15}

As manifestações clínicas da COVID-19 diferem de acordo com a idade, no entanto, dentre os principais sintomas, os mais frequentes são: febre, fadiga, tosse seca e dor de cabeça. Sintomas menos frequente como anosmia, ageusia, diarreia, hemoptise, dor de garganta, dor no peito, calafrios, náuseas e vômitos, também são relatados. Em virtude de vários fatores, os jovens respondem de maneira mais eficiente contra a COVID-19 e muitos, na maioria das vezes

são assintomáticos. Já os idosos, principalmente aqueles que apresentam algumas comorbidades, constituem um importante grupo de risco para a doença, pois nestes, o desenvolvimento da forma grave é mais frequente.^{14,16}

Parte dos pacientes com COVID-19, principalmente os graves, apresentam baixa contagem de linfócitos, níveis aumentados de citocinas inflamatórias, ativação e disfunção de linfócitos, aumento de IgG e anticorpos totais. Sendo assim, indícios apontam que a infecção pode levar a síndromes graves, falência de órgãos e morte.^{14,16}

Em sua dinâmica de transmissão, o SARS-CoV-2 apresenta como principal mecanismo a transmissão respiratória, tendo a proximidade e ventilação como principais determinantes de risco de transmissão. Sendo assim, o vírus é transmitido principalmente quando uma pessoa infectada está em contato próximo a outra pessoa. Desse modo, o SARS-CoV-2 dissemina-se através da tosse, fala ou espirro de uma pessoa infectada, contendo pequenas gotículas ou partículas de aerossóis contendo o vírus.^{1,17}

Em continuidade, apesar de ter sido detectado em fluidos corporais distintos, como urina, líquido cefalorraquidiano, sêmen e fluidos oculares, a presença do coronavírus nesses fluidos não tem se equiparado à infecciosidade. Por outro lado, a transmissão vertical tem sido relatada, ainda que raramente e evidências apontam que fragmentos virais têm sido encontrados no leite materno. Entretanto, apesar desse achado incomum, esses casos de infecção por SARS-CoV-2 têm sido associados a sintomas leves em neonatos.¹

Por outro lado, as transmissões nosocomiais foram amplamente descritas no início da pandemia, uma que, as medidas sanitárias de combate e prevenção a COVID-19, ainda não tinham sido instaladas. Dessa forma, muitos profissionais de saúde que integram na linha de frente do combate ao vírus foram amplamente expostos à contaminação.¹

2.1.1 Epidemiologia e diagnóstico

Segundo a OMS, o padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 é a biologia molecular, uma vez que esta utiliza-se da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificar o material genético do vírus. Variações da técnica como a RT-PCR (do inglês, Real Time-PCR) que amplifica o material genético do vírus em tempo real e o sequenciamento parcial ou total do material genético do coronavírus, são ferramentas moleculares muito úteis no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2. As amostras utilizadas nesta técnica são obtidas pela coleta do aspirado nasofaríngeo (ANF) por swab nasal e oral, e pelas secreções respiratórias do trato inferior, como escarro, lavado traqueal ou lavado broncoalveolar.^{3,18,19}

A maioria dos kits comerciais de PCR para SARS-CoV-2 apresentam quase 100% de sensibilidade caso não ocorra contaminação cruzada durante o tratamento da amostra. O momento ideal para que se realize este tipo de teste é logo após o aparecimento dos sintomas, entre o 3º e o 5º dia, se estendendo até o 10º dia após o ocorrido. Além disso, apesar da alta sensibilidade dos testes moleculares, na presença de um resultado negativo não se deve descartar completamente a infecção por SARS-CoV-2 e é recomendado que haja a combinação do resultado com observações clínicas e histórico do indivíduo, considerando o contexto epidemiológico da região a qual o mesmo está inserido.^{3,18,19}

No entanto, assim como outros vírus o SARS-CoV-2 evoluiu muito desde o início da pandemia, acumulando ao longo do tempo muitas variantes que trouxeram grande preocupação à população e a comunidade científica. Sendo assim, o surgimento dessas variantes pode alterar propriedades do vírus e isso pode resultar em aumento da ligação entre a proteína spike e o receptor ACE2, aumento da infectividade e aumento da transmissibilidade, por exemplo. Além disso, o desempenho de vacinas, medicamentos terapêuticos, ferramentas de diagnóstico ou outras medidas sociais e de saúde pública, podem ser perigosamente afetadas.^{3,18,20}

Atualmente, os principais sistemas de nomenclatura utilizados pelos cientistas para caracterizar e categorizar essas alterações genéticas são o GISAID, Nextstrain e Pango. Entretanto, com o intuito de uma melhor compreensão sobre essas variantes e visando a padronização na nomenclatura, a OMS³ convocou o Grupo Técnico Consultivo sobre Evolução de Vírus, além de representantes do GISAID, Nextstrain e Pango, e diversos especialistas em nomenclatura e comunicação virológica, para considerar possíveis terminologias fáceis de pronunciar e não estigmatizantes para as variantes de interesse e variantes de preocupação. Nessa conjuntura, a OMS³ junto a este grupo de especialistas tem recomendado o uso de letras do alfabeto grego para nomear variantes do SARS-CoV-2.^{3,18,20}

Desse modo, a OMS³ define o termo variante de interesse como: uma variante do SARS-CoV-2 que apresenta alterações genéticas que são previstas ou conhecidas por afetarem as características do vírus, como transmissibilidade, gravidade da doença, escape imunológico, escape diagnóstico ou terapêutico. Além de ser identificada por causar transmissão comunitária significativa ou múltiplos aglomerados de COVID-19, em vários países com prevalência relativa crescente, juntamente com o aumento do número de casos ao longo do tempo, ou outros impactos epidemiológicos aparentes que sugerem um risco emergente para a saúde pública global.^{3,20,21}

Assim sendo, o termo variante de preocupação é definido pela OMS³, como: uma variante do SARS-CoV-2 que atende à definição de variante de interesse e, através de uma análise comparativa, demonstrou associação a uma ou mais das seguintes alterações em um grau de significância para a saúde pública global:

- I. Aumento da taxa de transmissibilidade ou mudança prejudicial na epidemiologia de COVID-19;
- II. Aumento na virulência ou alteração na apresentação clínica da doença;
- III. Diminuição da eficácia das estratégias de saúde pública e social ou de diagnósticos, vacinas e terapias disponíveis;

De acordo com a OMS³, as variantes de preocupação circulando atualmente, são subvariantes da Ômicron (B.1.1.529), que inclui BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, formas recombinantes circulantes BA.1/BA.2 e linhagens descendentes. A variante Ômicron, foi detectada pela primeira vez na África do Sul, mas acabou sendo detectada em outros países simultaneamente, mudando a situação epidemiológica da doença no mundo. Essa, acumula mais de 50 variações em seu genoma, incluindo 30 mutações somente na proteína spike. Aliado a isso, as variantes Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) e Delta (B.1.617.2), também foram categorizadas como variantes de preocupação que circularam anteriormente e que trouxeram grande preocupação, uma vez que, o surgimento dessas variantes pode influenciar a transmissibilidade viral, virulência e taxa de reinfecção, escapando da imunidade natural e imunidade induzida por vacinas.^{20,22}

Dentre as variantes de preocupação que circularam anteriormente e que permanecem sob vigilância da OMS, destaca-se aqui a variante Gamma (P1), que foi detectada pela primeira vez em quatro viajantes retornando ao Japão do estado do Amazonas no Brasil em 2 de janeiro de 2021. Naveca e colaboradores,²³ realizaram uma investigação genômica sobre a diversidade genética das variantes que circulavam no Amazonas, e demonstraram que a mesma comporta 21 mutações definidoras de linhagem, incluindo dez dessas variantes na proteína Spike. Além disso, os referidos autores demonstraram que a variante Gamma evoluiu de um clado local B.1.1.28 no final de novembro de 2020 e substituiu rapidamente a linhagem parental, sendo a variante responsável pela maioria dos casos de COVID-19 no Amazonas no final de 2020 e início de 2021, estabelecendo a segunda onda de casos da doença no estado.

Globalmente, foram confirmados 767.726.861 casos de COVID-19 e 6.948.764 mortes pela doença, até 10 de julho de 2023. Até a mesma data, o Brasil contabilizava 37.682.660 casos e 704.159 óbitos pela COVID-19, com 1,9% de letalidade. No Amazonas, até 05 de julho de

2023, foram contabilizados um total de 636.953 casos de COVID-19 e 14.479 mortes pela doença.^{19,24} No entanto, em virtude da tendência de queda no número de casos e óbitos, declínio nos registros de hospitalizações em UTI e tendo em vista do avanço da vacinação no mundo, em 05 de maio de 2023, a OMS declarou o fim da pandemia de COVID-19.

2.1.2 Estrutura viral e organização genômica do SARS-CoV-2

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados com diâmetro de 60 a 130nm que contêm um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples de sentido positivo, com tamanho variando de 26 a 32 kilobases (Kb) de comprimento, como ilustra a figura 1 e 2. Esse vírus pode apresentar capsídeos pleomórficos e ter projeções radiais superficiais no formato de uma coroa, da qual se origina o nome coronavírus.^{15,25}

Os CoVs podem ser divididos em grupos distintos conforme critérios genéticos e antigênicos: α -CoVs, β -CoVs e γ -CoVs. Os CoVs infectam principalmente aves e mamíferos, de modo que, α - e β -CoVs também são capazes de infectar mamíferos e, portanto, podem causar infecção em humanos.^{1,15,25}

O atual SARS-CoV-2, responsável pelo terceiro surto de CoV na história registrada de seres humanos, pertence à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus* e está incluso no grupo IV pela classificação de Baltimore, com genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA), com aproximadamente 26 a 32kb. A partícula viral é envelopada, com morfologia esférica com 100 a 160nm de diâmetro.^{15,26}

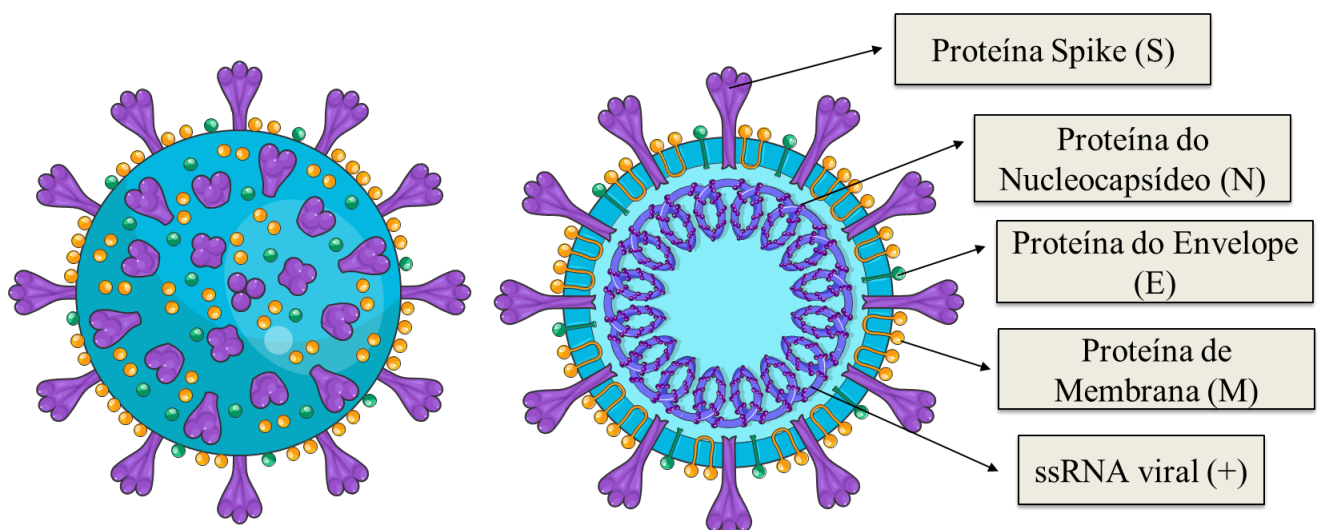


Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2.
Fonte: Traduzido e adaptado de Hartenian¹⁵

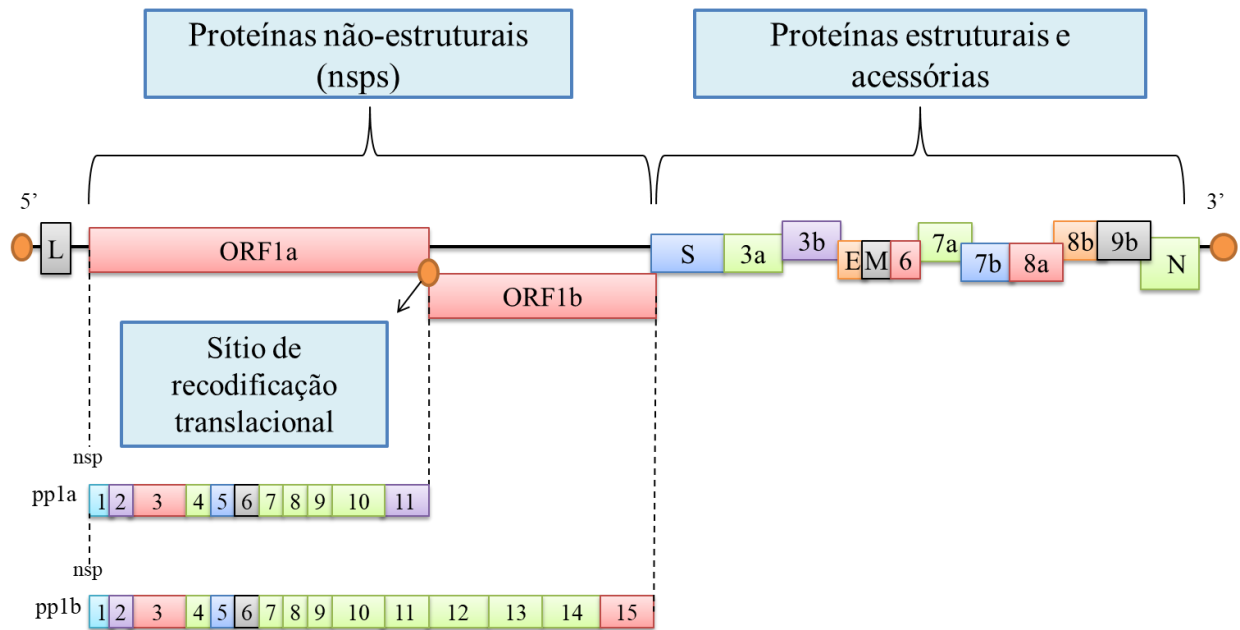


Figura 2: Genoma do SARS-COV-2.
Fonte: Traduzido e adaptado de Hartenian¹⁵

O genoma do SARS-CoV-2 organiza-se no sentido 5' junto a uma cauda 3' poli (A) e apresenta quatorze Regiões Abertas de Leitura (do inglês, ORF – Open Reading Frame) que são essenciais à maquinaria viral. No entanto, são as regiões ORF1a e ORF1b, que codificam quatro proteínas estruturais, sendo a proteína spike (S), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N), além de dezesseis proteínas não estruturais (nsp1-nsp16). Outras nove proteínas acessórias (Orf3a, Orf3b, Orf6, Orf7a, Orf7b, Orf8, Orf9b, Orf9c, Orf10, Orf11, Orf112, Orf13 e Orf14) também são codificadas pelo restante do genoma viral.^{15,25}

Essas proteínas são de suma importância para o ciclo de vida do vírus, pois são muito essenciais para a replicação viral e modulação da resposta imune do hospedeiro a partir do contato com moléculas do sistema imunológico.¹⁵

2.1.3 Replicação e transmissão do SARS-CoV-2

Para adentrar a célula hospedeira, o SARS-CoV-2 usa duas proteínas importantes como portas de entrada, a ACE2 e a Serino-Protease Transmembrana 2 (TMPRSS2). Em continuidade, a proteína Spike (S) do SARS-CoV-2, apresenta dois sítios importantes para esta etapa do ciclo de vida do vírus: os sítios S1 e S2. Esses sítios apresentam regiões chamadas Domínio de Ligação ao Receptor (RBD), que interagem com o receptor ACE2 da célula hospedeira.^{1,15,25}

Sendo assim, a região RBD do sítio S1 da proteína spike interage com o receptor ACE2, e em seguida, a TMPRSS2 atua clivando os sítios S1 e S2, favorecendo a entrada do vírus na

célula. A partir disso, ocorre a ativação do sítio S2 da proteína spike, que ativa a fusão da membrana viral à membrana celular, e posteriormente, o genoma viral é liberado no citosol.^{1,25}

A figura 3 ilustra como a maquinaria da célula hospedeira inicia a tradução do RNA viral, e em seguida ocorre a produção de polipeptídios virais que posteriormente sofrem clivagem proteolítica, e após isso, juntam-se formando os Complexos de replicação e Transcrição (RTCs). Esses RTCs, consistem em estruturas de membrana dupla derivadas do retículo endoplasmático rugoso, e criam um ambiente estável para a replicação e transcrição de mRNAs subgenômicos, e são capazes de isolar o RNA do SARS-CoV-2 de todo ambiente intracelular. Uma característica importante desses RTCs, é o provável impedimento da detecção de produtos da replicação viral, através de sensores imunológicos.^{15,25}

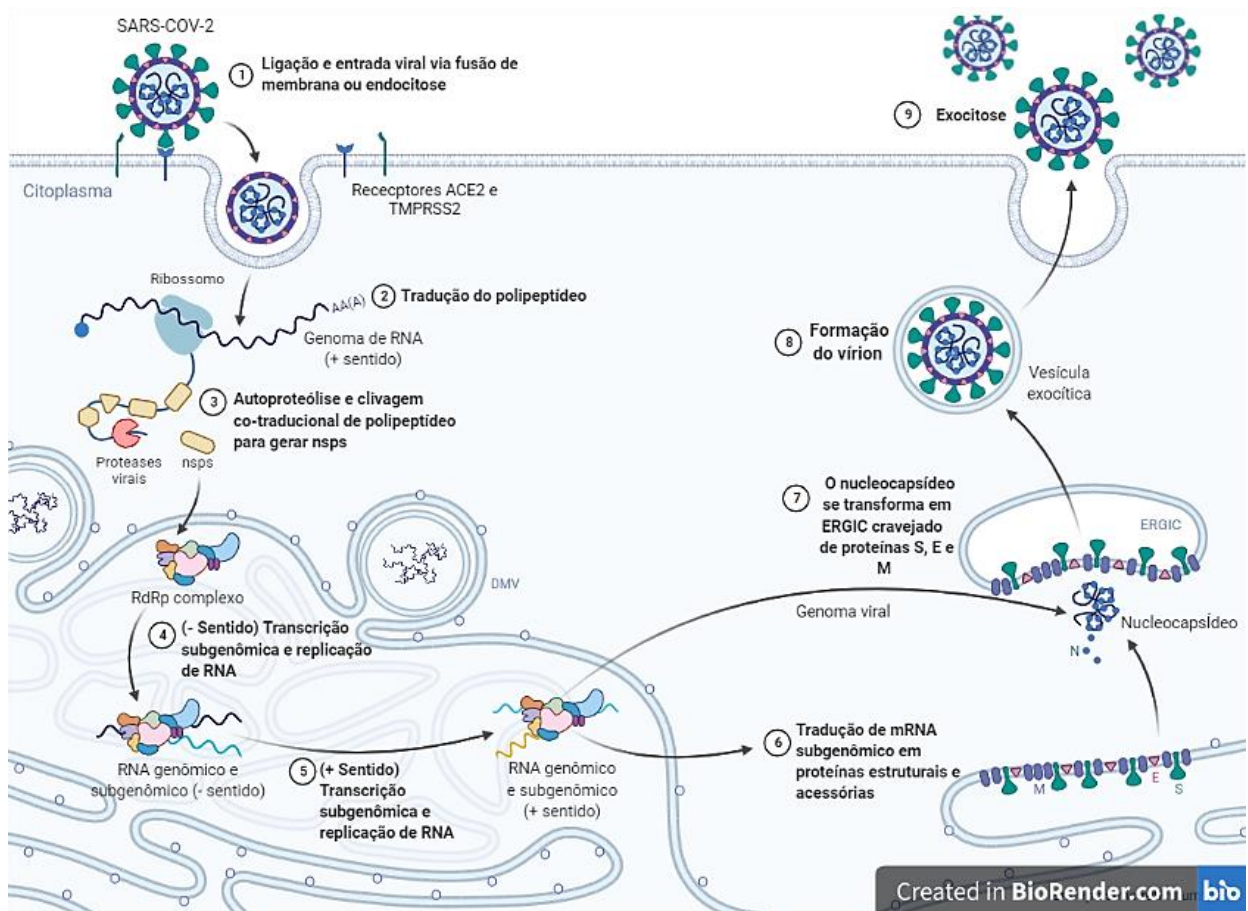


Figura 3: Representação gráfica da replicação do SARS-CoV-2 na célula infectada.

Fonte: Traduzido de Hartenian¹⁵

Após a tradução, as proteínas estruturais já traduzidas, são direcionadas ao retículo endoplasmático e transitam dentro dele em direção ao complexo de Golgi para interagirem com RNAs recém-produzidos e N-encapsidados. Após esta etapa da replicação, ocorre o brotamento

dessas moléculas no lúmen das vesículas secretoras, e finalmente os virions são secretados da célula hospedeira por exocitose.^{15,25}

2.1.4 Características clínicas da COVID-19 e resposta imunológica

A infecção por SARS-CoV-2 pode ser desde ausência de sintomas (assintomáticos) a manifestações clínicas muito heterogêneas, com síndromes graves e possíveis complicações, como trombose, lesões cardíacas, lesões hepáticas, sepse e falência respiratória.⁹

O comprometimento pulmonar encontrado na COVID-19, envolve dano alveolar difuso, microtrombose pulmonar, e outras consequências decorrentes da infecção pelo vírus. Os pneumócitos tipo II, são células pulmonares que amplamente expressam o receptor ACE2 - que é a porta de entrada do SARS-CoV-2 - em sua superfície. Células renais, hepáticas e cardíacas, também apresentam ACE2 em sua membrana, o que sugere que indivíduos com comorbidades tendem a desenvolver sinais e sintomas mais grave da doença.⁹

O Ministério da Saúde² estima que, 40% dos infectados por SARS-CoV-2 podem apresentar sintomas leves da doença, ao passo que, outros 40% podem desenvolver sintomas moderados. No total 15% podem desenvolver sintomas graves com necessidade de suporte de O₂ e 5% podem manifestar a forma grave da doença e desenvolver algumas das complicações acima citadas.

Desse modo, a classificação dos casos com base na sintomatologia dos doentes feita pelo Ministério da Saúde², consiste em:

- I. Caso assintomático - caracteriza-se por teste laboratorial de positivo para SARS-CoV-2, com ausência de sintomas.
- II. Caso leve - caracteriza-se pela presença de sintomas não específicos, como tosse, dor de garganta ou coriza, seguido ou não de anosmia, ageusia, diarreia, dor abdominal, febre, calafrios, mialgia, fadiga e/ou cefaleia.
- III. Caso moderado – caracterizado pela presença de sintomas que vão de sintomas leves e tosse e febre persistente diária, até sinais de piora progressiva de outro sintoma relacionado à covid-19 (adinamia, prostração, hiporexia, diarreia), além da presença de pneumonia sem sinais ou sintomas de gravidade
- IV. Caso grave – caracteriza-se por Síndrome Gripal com dispneia e/ou desconforto respiratório ou pressão persistente no tórax ou saturação de oxigênio menor que 95% em ar ambiente ou cianose em lábios e rosto. Em crianças, observa-se taquipneia ≥ 70 rpm em menores de 1 ano e ≥ 50 rpm em crianças maiores de 1 ano, além de hipoxemia, desconforto respiratório, alteração da consciência, desidratação, dificuldade para se alimentar, lesão miocárdica, elevação de enzimas hepáticas, disfunção da coagulação, cianose central ou SpO₂ <90-92%

em repouso e ar ambiente, letargia, convulsões, dificuldade de alimentação/recusa alimentar.

- V. Caso crítico – dentre os sintomas mais frequentes estão: sepse, síndrome do desconforto respiratório agudo, insuficiência respiratória grave, falência de órgãos, pneumonia grave, necessidade de suporte respiratório e internações em UTI.

Achados laboratoriais sugerem alterações, como linfocitopenia, trombopenia, neutrofilia, níveis aumentados de proteína C reativa, dímero D, lactato desidrogenase. Em exames radiológicos, pacientes acometidos pela doença, podem apresentar opacidade em vidro fosco e sombreamento irregular bilateral nos pulmões.⁹

Uma resposta imune antiviral efetiva do hospedeiro deve envolver mecanismos da imunidade inata e adaptativa, incluindo a síntese de diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de macrófagos e granulócitos pró-inflamatórios. A ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B são essenciais para controlar a replicação viral, limitando a disseminação do vírus, eliminação das células infectadas e regulação de danos teciduais.^{4,27}

Assim como outros CoVs, supõe-se que o SARS-CoV-2 pode induzir uma resposta imune protetora mediada por linfócitos T. No entanto, pacientes com COVID-19 hospitalizados normalmente manifestam linfopenia, sugerindo que a imunidade celular pode ser suprimida pelo vírus. Uma redução expressiva de células T CD4⁺, T CD8⁺, células NK e células B, foram observadas em pacientes graves. Aliado a isso, foram observados fenótipos de exaustão em células T de pacientes com COVID-19. No entanto, em alguns pacientes a quantidade de células B pode estar dentro na faixa de normalidade, demonstrando que essa população celular pode não ser tão afetada quanto as demais populações celulares já citadas anteriormente.^{6,10,28}

Um conjunto de mecanismos da resposta imune inata, como superfícies mucosas, IgA presente nas mucosas, células dendríticas, macrófagos, monócitos e neutrófilos, junto ao reconhecimento da infecção viral por receptores citosólicos e de membrana, são sugeridos como iniciadores da resposta a infecção por SARS-CoV-2.²⁹

O neutrófilo, célula da imunidade inata mais abundante no sangue, é descrito como um potente impulsor da hiperinflamação em pacientes com COVID-19, visto que há uma regulação positiva dos neutrófilos nesses pacientes. Durante a infecção viral, algumas evidências sugerem que os neutrófilos contribuem com a resposta imunológica como células imunomoduladoras, secreção de citocinas, internalização do vírus e produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Ademais, foi observado que a relação neutrófilo-linfócito

se encontra aumentada em pacientes graves, o que pode contribuir para um curso clínico desfavorável da doença.^{6,30}

A sinalização desencadeada pela ativação de receptores imunológicos, como os TLRs resulta na transcrição e expressão de genes pró-inflamatórios, como a via dos IFNs, importante citocina envolvida na resposta imunológica na COVID-19.⁴

Em continuidade, um desequilíbrio na resposta imunológica pode favorecer o aumento expressivo da secreção de citocinas e quimiocinas, especialmente na forma grave da COVID-19. Esse fenômeno tem sido frequentemente relatado, e o termo Síndrome da Tempestade de Citocinas tem sido amplamente utilizado, com o intuito de elucidar os mecanismos imunológicos que desencadeiam a ativação da produção descontrolada de mediadores pró e anti-inflamatórios no âmbito da COVID-19. Como característica importante da doença, que pode levar a várias reações adversas em diferentes órgãos do corpo, o aumento exacerbado de mediadores imunológicos, incluindo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IP10, CCL2, CCL3, IFN- γ e TNF- α , podem levar a Síndrome de Ativação de Macrófagos e causar o aumento de proteína C reativa, o que pode ocasionar um prolongamento do dano pulmonar.^{1,6,29}

Dessa forma, a alta concentração de mediadores pró e anti-inflamatórios no sistema circulatório, além de amplificar o dano tecidual no endotélio, pode levar ao aumento da vasodilatação, maior recrutamento de células imunológicas, função de endotelial de barreira prejudicada, favorecimento de ambiente hipóxico, ocasionando insuficiência respiratória.^{1,6,29}

No contexto da resposta imune adaptativa, semelhantemente a outras infecções virais, o SARS-CoV-2 aparenta induzir uma resposta imunológica adaptativa do tipo Th1. No entanto, em pacientes com a forma grave da doença, uma redução de células T CD4⁺, T CD8⁺ e T reguladoras têm sido observadas, além de atrofia em órgãos como baço e linfonodo. Um padrão de exaustão funcional de células TCD8⁺ também tem sido relatado, com a expressão de moléculas como PD-1 e TIM-3 indicando esta condição.^{29,31}

De maneira geral, a amplitude e o desempenho das respostas por anticorpos têm estado em constante análise, tendo em vista que, estes podem ser instrumentos utilizados no diagnóstico da infecção. Os anticorpos neutralizantes são importantes ferramentas de bloqueio da replicação viral, e portanto, contribuem ativamente para o sucesso da eliminação viral ou controle de progressão da doença. O principal alvo da neutralização mediada por anticorpos na COVID-19, é a subunidade S1 da proteína Spike do SARS-CoV-2, possivelmente por ela ser crucial no início da infecção. Apesar disso, cada paciente tem uma cinética de resposta

imunológica diferente, o que pode refletir na baixa detecção de anticorpos nos primeiros dias da doença, apontando que o uso da sorologia tem valor limitado.^{29,31}

Como ferramenta de extrema importância no combate a COVID-19, a vacinação tem sido essencial na prevenção de manifestações clínicas severas e possíveis complicações decorrentes da doença, e sua eficácia tem sido amplamente comprovada.^{29,31}

2.1.5 Plasma convalescente

Visando o estabelecimento de terapias rápidas e capazes de controlar a disseminação desenfreada do vírus ao redor do mundo, vários países juntaram esforços conjuntos em pesquisas sobre medidas profiláticas capazes de diminuir o número de internações e óbitos pela COVID-19. Nesse sentido, o plasma convalescente configura-se como uma das terapias mais antigas já usadas, tendo em vista que, seu primeiro uso data de 1890 no tratamento de tétano e difteria, antes da disponibilidade de antimicrobianos.³²⁻³⁶

O fundamento inicial sobre o uso de plasma convalescentes em doenças infectocontagiosas, consiste na capacidade em fornecer imunidade passiva através de amostras de sangue contendo anticorpos neutralizantes coletadas de um indivíduo recuperado da infecção, e que são administradas em receptor susceptível, acometido da mesma infecção que por vezes pode ser imunocomprometido ou produzir baixas quantidades de anticorpos.³²⁻³⁶

O potencial terapêutico do plasma convalescente é baseado principalmente na atuação dos anticorpos neutralizantes, que possuem a capacidade de eliminar o vírus do organismo de indivíduos infectados, através da neutralização do vírus, ativação do sistema complemento, fagocitose e citotoxicidade celular mediada por esses anticorpos, por exemplo. Ademais, o plasma de indivíduos convalescentes, apresenta uma quantidade considerável de mediadores imunológicos que podem ou não auxiliar na resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2.³²⁻³⁶

Nesse contexto, apesar da facilidade de obtenção do plasma convalescente, a dificuldade em estabelecer uma titulação de anticorpos presentes no plasma suficientes para uso, a possibilidade de reação cruzada desses anticorpos com outros agentes infecciosos, aliadas a evidências de que alguns pacientes apresentavam titulações elevadas de anticorpos no décimo dia de sintomas, dificultaram o uso do plasma como terapia.³²⁻³⁶ Além disso, a alta demanda de plasma convalescente que superou em muito a oferta, junto ao advento das vacinas, reforçaram a descontinuidade no uso de plasma convalescente como terapia no tratamento de pacientes com COVID-19. No entanto, a necessidade de compreensão da dinâmica da resposta imunológica em indivíduos convalescentes da infecção, fomentou a continuidade das pesquisas.

2.2 Gene *TREMI*

O gene *TREMI* (HGNC: 17760) está localizado no cromossomo 6p21.1, apresenta 19.289pb e 6 éxons, e codifica duas isoformas de proteínas: uma ligada a membrana celular que atua como receptor da imunidade inata, denominada Receptor Desencadeante Expresso em Células Mielóides – 1 (TREM-1), e a isoforma solúvel de TREM-1, comumente referida como Receptor Desencadeante Solúvel Expresso em Células Mielóides – 1 (sTREM-1).^{7,37,38}

O receptor TREM-1 consiste em uma glicoproteína formada por 234 aminoácidos, que possui aproximadamente 30 kDa, e atua como ativador de superfície celular como membro da superfamília de imunoglobulinas. Como um potente indutor e amplificador de respostas inflamatórias, é altamente expresso em células Mielóides, especialmente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Também é expresso em células teciduais, como células epiteliais brônquicas, células córneas, gástricas e células endoteliais hepáticas^{37,38}.

O receptor TREM-1 localiza-se na superfície celular de diversos tipos celulares, e sua estrutura consiste em um domínio extracelular do tipo V, uma porção transmembranar carregada e uma cauda intracitoplasmática curta. Em algumas doenças, a ativação do receptor TREM-1 promove aumento significativo na secreção citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , CXCL8, TNF α , MCP-1, MPO, CCL2 e CCL7, dentre outras.^{37,38} Além disso, sua ativação favorece o aumento da adesão de células mielóides ao endotélio e moléculas de matriz extracelular, promove aumento do fluxo de cálcio intracelular, e desencadeia a ativação das moléculas ERK1, ERK2 e PLC- γ , por fosforilação da tirosina.

A porção solúvel do receptor TREM-1 (sTREM-1), é um peptídeo de aproximadamente 27kDa que tem sido amplamente estudado como possível biomarcador e alvo terapêutico em algumas doenças. Esta forma solúvel pode originar-se através de dois mecanismos principais, ilustrados na figura 6: 1) tradução de *splicing* alternativo do RNA mensageiro de *TREMI* ou 2) por ação proteolítica de metaloproteinases que clivam parte do receptor após ele ser ativado.^{39,40}

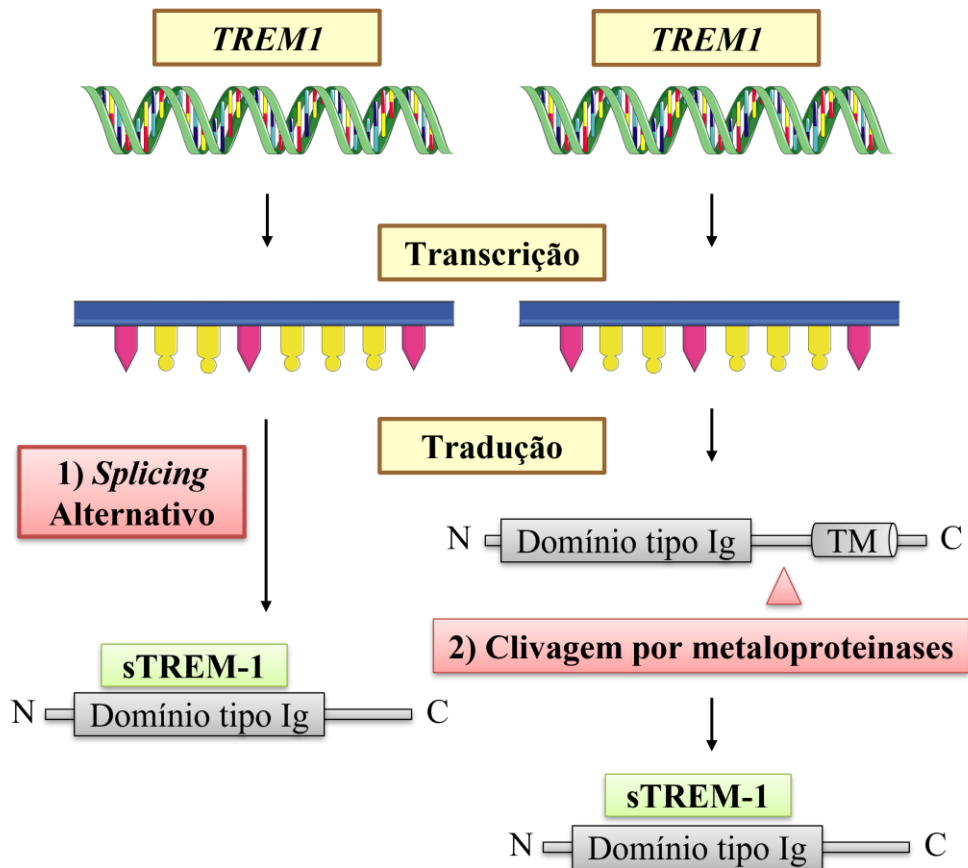


Figura 4: Representação esquemática das duas hipóteses de origem do sTREM-1.

Fonte: Adaptado e traduzido de Tammaro.⁴¹

2.2.1 Sinalização TREM-1/DAP12

O complexo TREM-1/DAP12 é estabilizado por meio de uma interação eletrostática única entre um ácido aspártico carregado negativamente em uma porção da proteína DAP12, e uma lisina carregada positivamente no domínio intracitoplasmático do receptor TREM-1 que são essenciais para a transdução da sinalização intracelular. A figura 5 ilustra a sinalização desencadeada pelo receptor TREM-1 quando ativado, que compartilha de sinergia com respostas imunológicas suscitadas por outros PRRs, como os receptores Toll-Like (TLRs), que respondem a ligantes como LPS, HSP-70, HMGB-1 e muitos outros PAMPs e DAMPs, em várias doenças.⁴¹⁻⁴³

O ectodomínio extracelular do tipo Ig é a estrutura responsável pela ligação dos ligantes ao receptor TREM-1, de modo que, é ele que inicia a cascata de sinalização intracelular, uma vez que, a partir desse evento ocorre a associação do domínio transmembranar de TREM-1 com a molécula DAP12. Em seguida, a porção da proteína DAP12 contendo uma região denominada Motivo de Ativação Baseado em Tirosina de Imunorreceptores (ITAM), é fosforilada, favorecendo o recrutamento e encaixe das tirosinas quinases SYK (do inglês Spleen Associated

Tyrosine Kinase) e ZAP70 (do inglês Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70)⁴¹⁻⁴³

A tirosina quinase SYK, estimula o recrutamento e fosforilação de moléculas adaptadoras que contêm Cbl (do inglês Linfoma Casitas B-lineage), SOS (do inglês Son of sevenless) e GRB2 (do inglês Growth Factor Receptor Binding Protein-2). A partir disso, ocorre a ativação das vias PLC, PI3K e ERK 1/2 e MAP quinases, que regulam a transcrição de genes pró-inflamatórios, promovem a mobilização de Ca⁺ intracelular, estimulam o rearranjo do citoesqueleto de actina, além de ativar fatores de transcrição como: ELK1 (do inglês ETS oncogene-related protein), NFAT (Fator Nuclear de Células T Ativadas), AP1, c-Fos, c-Jun e Nf-κB.⁴¹⁻⁴³

Estes eventos resultam na produção moléculas de superfície celular, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-8, IL-6, TNF-α, mieloperoxidase (MPO), MCP-1, CCL-2 e CCL-7, dentre outras. Han et al. (2018), também citam que a ativação de TREM-1 regula a sobrevivência de macrófagos através de Bcl-2, modifica a dinâmica da expressão de IRAK-M em células pulmonares e melhora a defesa do hospedeiro durante a pneumonia pneumocócica.^{41,42}

Tammaro⁴¹, ressaltam que a ativação da via PI3K e ERK estimulada por TREM-1, pode favorecer a sobrevivência celular por meio da inativação dos fatores pró-apoptóticos BAX (do inglês BCL-2-Associated X-Protein), BID e BAD, além de inibir a liberação do Citocromo C (Cyto-C) das mitocôndrias.

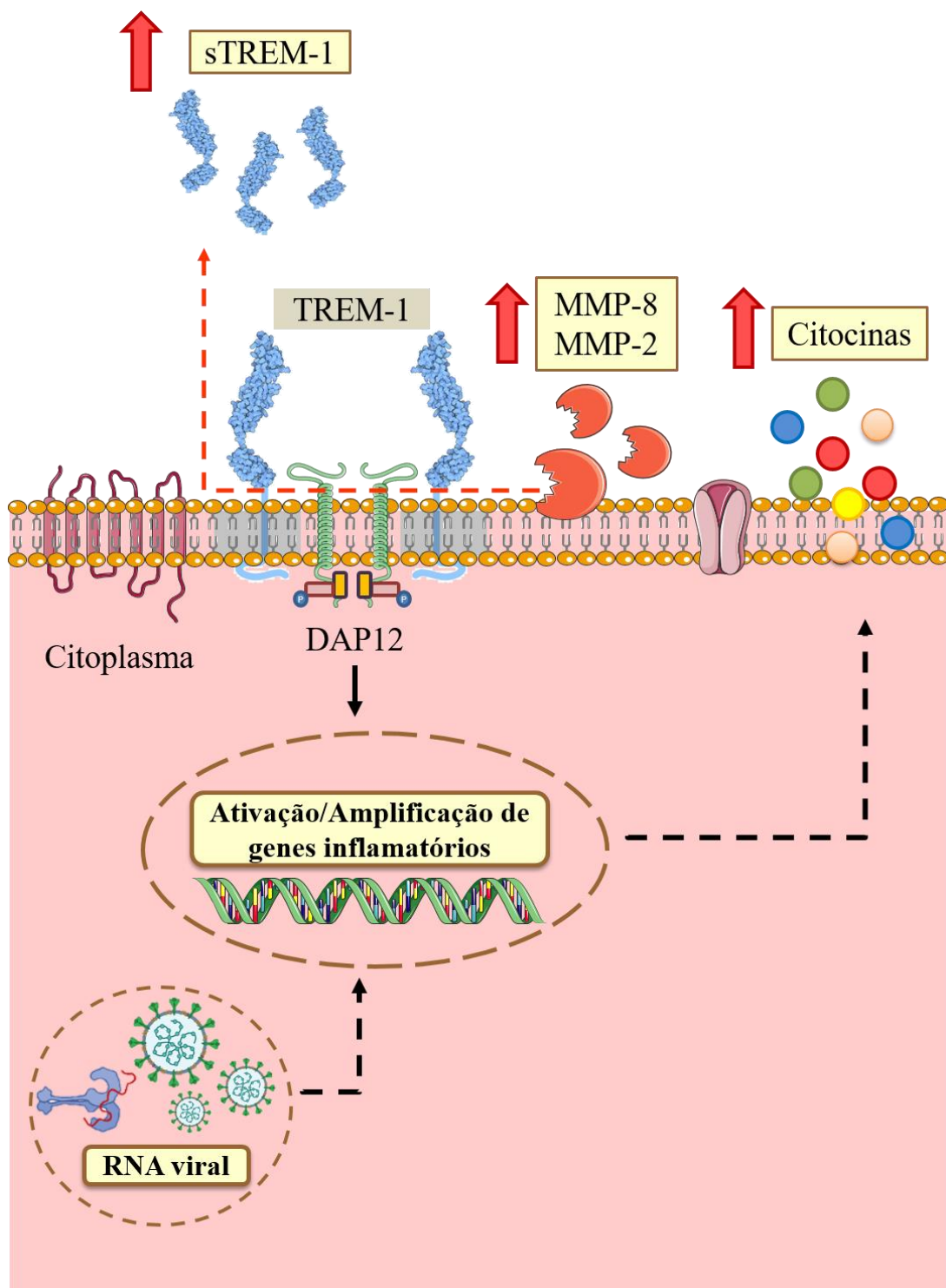


Figura 5: Possível mecanismo de ação do receptor TREM-1 e das metaloproteinases na resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2.

Fonte: Elaborado pela própria autora (não publicado), 2023.

2.3 Metaloproteinases

As metaloproteinases de matriz são uma superfamília de metcizin proteases, que estão inseridas do grupo das endopeptidases dependente de zinco, e atuam degradando componentes de matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, elastina, quimiocinas e citocinas, dentre

outras moléculas.^{44,45} Estas, também podem atuar promovendo remodelação tecidual, estimulando proliferação, migração e diferenciação celular. Dentre outras funções importantes, as metaloproteinases também podem desempenhar papéis fundamentais na angiogênese, apoptose e reparo tecidual.^{46,47}

Essas endopeptidases, são secretadas por várias células e tecidos como, tecido conjuntivo, células com atividade pro-inflamatória, incluindo fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais e demais tipos celulares.⁴⁶⁻⁴⁸

Quanto a sua estrutura e classificação, as metaloproteinases possuem características estruturais semelhantes: consistem em um pró-peptídeo com aproximadamente 80 aminoácidos, um domínio catalítico composto por cerca de 170 aminoácidos, um peptídeo ligante ou região de dobradiça de comprimento variável, e um domínio de hemopexina composto por cerca de 200 aminoácidos.⁴⁶⁻⁴⁸

Por esse motivo, as metaloproteinases compartilham de homologia no domínio catalítico de ligação ao zinco em sua estrutura, apresentam homologia em sua estrutura quando comparadas a MMP-1, e apresentam um motivo de ligação de troca de cisteína, no qual o grupo cisteína sulfidril que se liga ao sítio ativo de zinco, que por sua vez, mantém essas enzimas em sua forma inativa de proMMP.⁴⁶⁻⁴⁸

Grande parte das MMPs são produzidas e secretadas como zimogênio inativo, denominados proMMPs, e são reguladas em níveis diferentes que vão desde a regulação do mRNA a ações inibitórias por moléculas endógenas neutralizantes de MMPs, chamados Inibidores Teciduais de MMPs (TIMPs). A produção de algumas dessas enzimas que não são constitutivamente expressas por células in vivo, também pode ser induzida por citocinas, fatores de crescimento, hormônios e alterações em interações célula-componentes de matriz extracelular e interações célula-célula.⁴⁶⁻⁴⁸

Nos vertebrados, essa grande família de enzimas é composta por 28 moléculas, das quais ao menos 23 são expressas em tecidos humanos, e dessas, 14 são expressas em tecidos vasculares.⁴⁷ Dessa forma, por compartilharem essas características, elas podem ser classificadas em 5 categorias: Colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), Gelatinases (MMP-2 e MMP-9), Estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), Matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), Metaloproteinases de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25). Outras metaloproteinases não seguem essa classificação, como a MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 e MMP-28.⁴⁶⁻⁴⁸

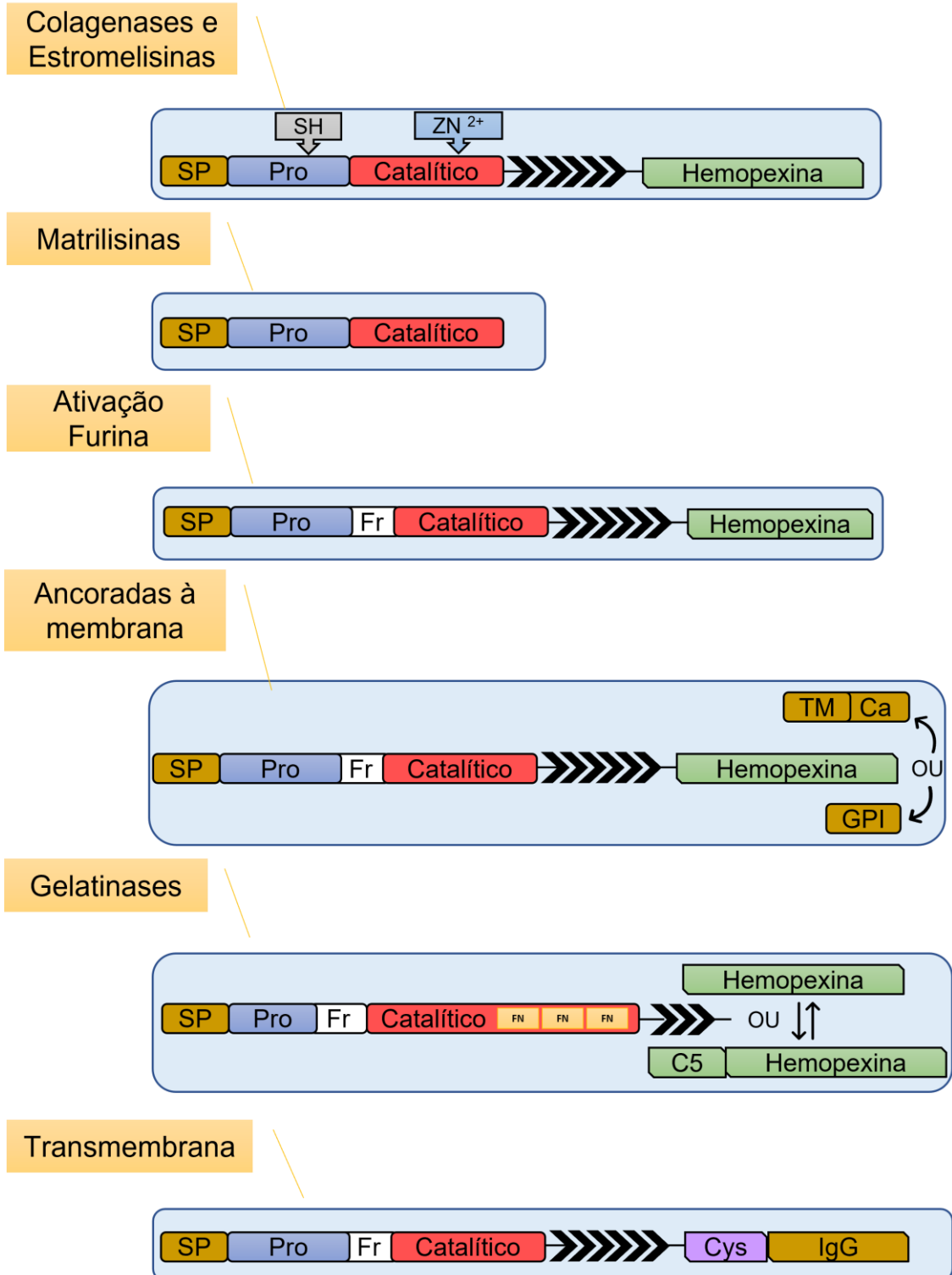


Figura 6: Representação Esquemática da estrutura das metaloproteínases de matriz.
Fonte: elaborado pela própria autora (não publicado), 2023.

A MMP-2 é amplamente expressa e distribuída no endotélio vascular, musculatura vascular lisa, leucócitos, plaquetas e veias varicosas, e apresenta como principal substrato, componentes de matriz extracelular (ECM) derivados do colágeno intersticial e não derivados do colágeno. Também apresenta como principais alvos e substratos, as MMP-9 e -13 ativas, Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF-R1), Proteína de Ligação ao Fator

de Crescimento 3 (IGF-BP-3) e Proteína de Ligação ao Fator de Crescimento 5 (IGF-BP-5), IL-1 β , pró-TNF- α , TGF- β .

Em um estudo realizado com 25 pacientes com infecção por HCV e 15 controles saudáveis, pareados por sexo e idade, foi demonstrado que os níveis de MMP-2 foram significativamente maiores em pacientes crônicos com HCV quando comparados ao grupo controle. Em continuidade, uma correlação significativa positiva para os níveis de MMP-2 foi vista para diferenciar pacientes com infecção crônica pelo HCV de controles saudáveis. Todavia, neste mesmo estudo, com base nos níveis de MMP-2, não foi possível estabelecer diferenciação entre pacientes com infecção por HCV com fibrose (Escala Metavir= F1-F3) e com cirrose (Escala Metavir= F4).⁴⁹

Em uma pesquisa adicional, foi realizado um estudo com 53 pacientes com COVID-19 internados em UTI e 28 indivíduos saudáveis como grupo controle, com o objetivo de investigar a associação entre os níveis plasmáticos de MMP-2, MMP-9 e TNF- α e achados clínicos e laboratoriais na COVID-19. Os autores da pesquisa observaram que os níveis de MMP-2 apresentaram redução significativa nos pacientes com COVID-19, quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Além disso, os níveis de MMP-2 foram avaliados em pacientes classificados de acordo com as variáveis hipertensão e obesidade, constatando-se que, em pacientes COVID-19 e hipertensão, os níveis de MMP-2 foram regulados positivamente em comparação aos indivíduos hipertensos do grupo controle e aos indivíduos sem hipertensão também do grupo controle.⁵⁰

A MMP-8, é amplamente expressa por neutrófilos, monócitos/macrófagos, condrócitos, e células musculares lisas, e apresenta como principais substratos as moléculas de colágeno I, II, III, fibronectina, Aggrecan e Ovostatin. Ainda, MMP-8 tem sido associada a renovação de tecido periodontal, atividade antiinflamatória e cicatrização de tecidos.⁵¹

No contexto da dinâmica das respostas imunológicas, embora sejam apontadas na literatura evidências sobre a relação de polimorfismos nos receptores TREM-1 que contribuem para respostas inflamatórias em várias doenças, no que tange a COVID-19, a relação desses polimorfismos com as características clínicas da doença é desconhecida, bem como a frequência desses eventos em nossa população. Sendo assim, há necessidade de outras pesquisas que possibilitem o conhecimento dos efeitos dessas variantes na COVID-19.

2.3.1 Variantes do gene *TREMI*

A variante rs2234237 é classificada como uma variante *missense* e se localiza no éxon 2 do gene *TREMI* (*HGNC17760*), gerada em uma substituição do nucleotídeo adenina pelo nucleotídeo timina na posição 41282728 da sequência nucleotídica do gene. Essa variante,

promove uma mudança no aminoácido presente na posição 73 da cadeia polipeptídica, substituindo a serina pela treonina. Já a variante rs2234246, está localizada próximo ao éxon 4 do gene *TREMI* (*HGNC17760*), a 41276002 pares de base da região promotora 3' UTR, e consiste na mudança do nucleotídeo citosina pelo nucleotídeo timina. Esta, por sua vez, constitui-se de uma região de cromatina aberta propensa a sofrer interferências de mecanismos epigenéticos, como metilação e acetilação.^{52,53}

Nesse sentido, considerando-se a grande variabilidade fenotípica e genética da população brasileira, com padrões alélicos e haplotípicos distintos, constata-se a importância da realização de estudos genéticos da imunidade inata em uma população tão miscigenada. A confirmação dos resultados alcançados em trabalhos realizados em outras populações, juntamente com dados a partir deste estudo, podem fornecer uma melhor compreensão das possíveis associações do polimorfismo em *TREMI* com a resposta inflamatória à infecção por SARS-CoV-2, especialmente na população do Amazonas.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Descrever a influência das variantes no gene do receptor TREM-1 e sua possível associação com o perfil de citocinas e sTREM-1 em pacientes de fase aguda da COVID-19 e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2.

3.2 Específicos

- Estimar a frequência das variantes *TREMI* A/T (rs2234237) e C/T (3' UTR) (rs2234246) em pacientes de fase aguda da COVID-19 e indivíduos convalescentes;
- Avaliar possível associação das variantes no gene do receptor TREM-1 com a concentração de mediadores imunológicos na resposta imunológica ao SARS-CoV-2;
- Verificar possível associação entre o perfil de mediadores imunológicos com os dados clinico-epidemiológicos dos em pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes;
- Investigar possível relação entre as concentrações plasmáticas de sTREM-1 com gravidade e mortalidade da COVID-19, buscando possível associação com o mediadores solúveis e dados clínicos-epidemiológicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, exploratório, em pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2, atendidos no HEMOAM e internados em enfermaria ou UTI do HUGV.

Este estudo configurou-se como um subprojeto de um projeto maior da linha de pesquisa sobre COVID-19 do Grupo de Pesquisa em Hematologia, realizado em pacientes de fase aguda da COVID-19 atendidos no Hospital Universitário Getúlio Vargas e na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, intitulado “*Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19)*”, e as atividades foram desenvolvidas de acordo com o item 4.3, descrito abaixo.

4.2 Aspectos éticos

As amostras utilizadas no presente estudo, foram obtidas a partir dos projetos intitulados: “*Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).*”, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) sob respectivo nº de parecer: 4.126.784, coordenado pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, e “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*”, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) sob respectivo nº de parecer: 1.982.466, coordenado pela Dra. Andréa Monteiro Tarragô. Ressalta-se que, do segundo projeto utilizamos apenas as amostras controles, que foram obtidas antes da pandemia.

4.3 Fluxograma de atividades

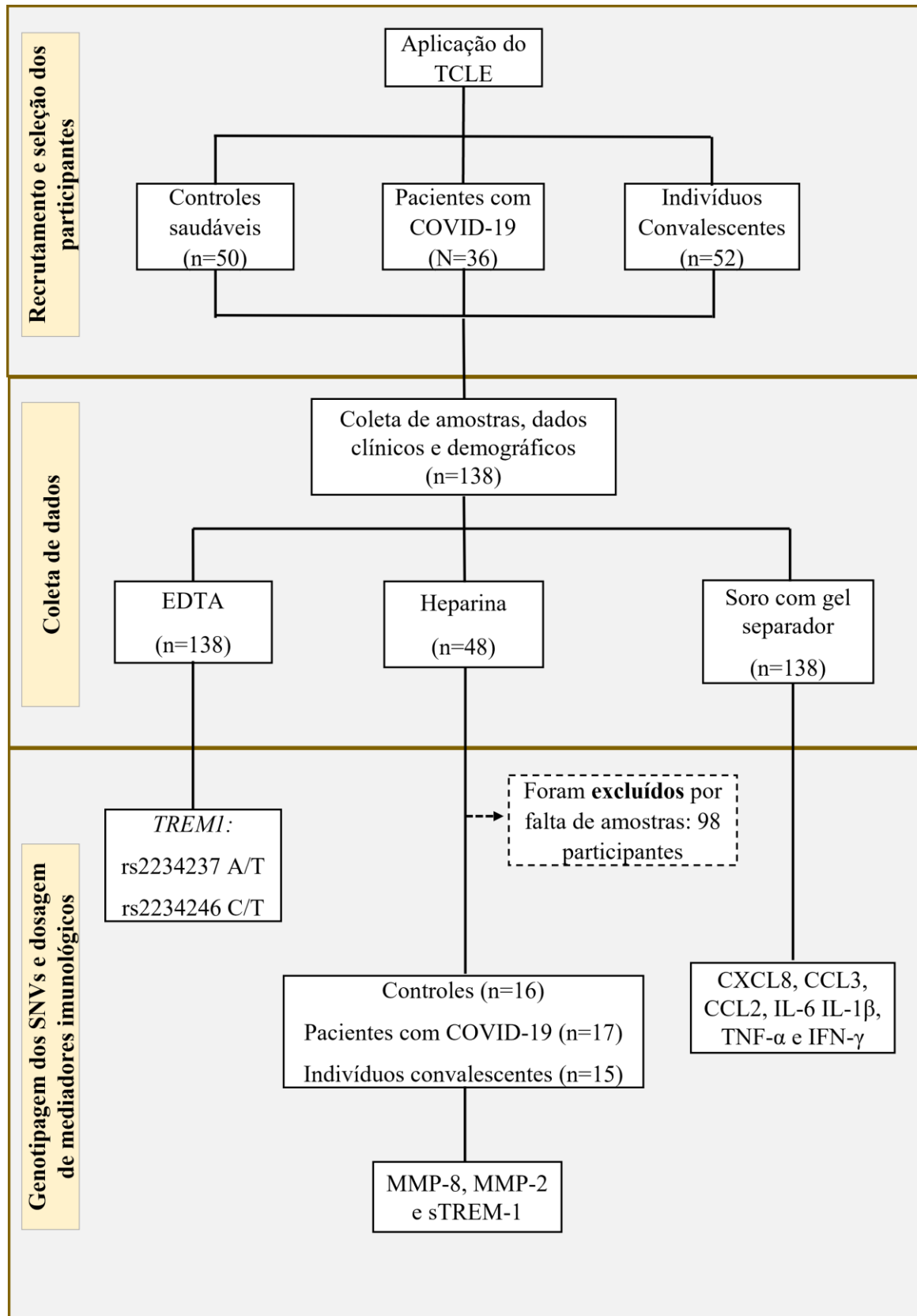


Figura 7: Desenho do estudo e flowchart. Foram incluídos 138 participantes para genotipagem e dosagem de alguns mediadores imunológicos.

4.4 População de estudo e amostragem

A população do presente estudo é composta pelos seguintes grupos:

- I. Grupo 1 (G1), composto por candidatos a doadores de sangue saudáveis (grupo controle), cujas amostras são oriundas do projeto “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV⁺ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*”, desenvolvido antes da pandemia de COVID-19.
- II. Grupo 2 (G2), composto por pacientes com COVID-19 internados em enfermaria ou UTI do HUGV (Hospital Universitário Getúlio Vargas), que aceitaram participar da pesquisa.
- III. Grupo 3 (G3), composto por pacientes convalescentes da infecção por SARS-CoV-2.

A amostragem é composta por 138 indivíduos participantes, sendo: 36 pacientes com COVID-19, 52 doadores de plasma convalescente da COVID-19, e 50 indivíduos controles. Esse total (n=138) foi utilizado na genotipagem das variantes no gene do receptor TREM-1, e na dosagem e quantificação de mediadores solúveis. Para a dosagem de metaloproteinases, foram selecionados aleatoriamente 16 controles saudáveis, 17 pacientes com COVID-19 e 15 doadores de plasma convalescente da COVID-19, conforme está ilustrado no fluxograma acima. Ressalta-se que, as amostras do grupo controle foram coletadas antes da pandemia de COVID-19.

4.5 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo:

- I. Doadores de sangue (G1 ou grupo controle)
 - a) Foram incluídos doadores com mais de três doações que não tiveram contato com indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2, uma vez que, estas amostras foram obtidas antes da pandemia de COVID-19. Estes dados foram coletados através de entrevista e que foram negativos nos testes de triagem sorológica para Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA) e sífilis (VDRL) e assinatura do Termo de Consentimento livre e Esclarecido - TCLE.
- II. Grupo de pacientes com COVID-19 ou G2:

Os indivíduos incluídos neste grupo, foram pacientes internados em enfermaria ou UTI de COVID-19 do Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV, que anuíram sua participação ao projeto. Estes pacientes foram contatados pela equipe de enfermagem/residentes/equipe

médica do hospital, para aplicação do TCLE ao paciente ou seus familiares. Dessa forma, foram incluídos:

- a) Indivíduos com infecção por SARS-CoV-2 confirmada por diagnóstico molecular e com COVID-19 estabelecida, atendidos no HUGV
- b) Ambos os sexos;
- c) Idade entre 18 e 60 anos;

III. Grupo de indivíduos convalescentes ou G3:

Foram incluídos pacientes convalescentes da infecção pelo SARS-CoV-2, atendidos no HEMOAM, e que seguiram os critérios de inclusão para a triagem dos pacientes convalescentes de acordo com as diretrizes:

- a) Indivíduos com resultado de RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 e assintomático há pelo menos 14 dias;
- b) Sexo masculino ou feminino;
- c) Idade entre 18 e 60 anos;
- d) Que durante a infecção por COVID-19, apresentaram comprometimento clínico com internação ou não;
- e) Que estejam aptos nas triagens clínica, hematológica, sorológica e molecular conforme portaria de consolidação 5 do Ministério da Saúde de 2017;
- f) Que possua anticorpos ou não anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 detectáveis;

Para estes pacientes, com o intuito de observar aspectos da resposta imunológica, como o perfil de mediadores imunológicos mediante a convalescência da infecção por SARS-CoV-2, utilizamos os seguintes tempos de coleta: D30 (30 dias após a infecção), D60 (60 dias após a infecção) e D90 (90 dias após a infecção).

4.6 Critérios de não-inclusão

Não foram incluídos grávidas e indígenas no presente estudo, e pacientes atendidos no HUGV que apresentaram resultado negativo para o diagnóstico molecular de infecção por SARS-CoV-2. Para o grupo 3, não foram incluídos candidatos com doença sintomática no momento de sua inclusão no estudo ou que ainda apresentavam teste RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, além de candidatos que apresentaram inaptidão em alguma das triagens: clínica, hematológica, sorológica ou molecular, conforme portaria de consolidação 5 do Ministério da Saúde de 2017.

4.7 Critérios de exclusão

Foram excluídos do presente estudo, indivíduos com amostra insuficiente para a realização dos testes e que não possuíam todos os tempos de coleta.

4.8 Coleta de dados

Dados sociodemográficos, sintomas clínicos, comorbidades, exames laboratoriais de rotina, exames imunológicos, intervenções clínicas e desfecho, foram coletados dos sistemas de prontuário eletrônico do HUGV. Para avaliação da gravidade clínica, e em virtude da ausência de dados que nos possibilitassem uma melhor classificação, esses pacientes foram classificados em grave e não-grave, conforme os seguintes critérios: uso de ventilação mecânica, internação em UTI ou enfermaria e desfecho clínico, obtidos diretamente do sistema de prontuário eletrônico do HUGV.

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos com sistema a vácuo. As coletas foram realizadas em 138 participantes do estudo, em tubo com gel separador (Gel BD SST® II Advance®) para dosagem e quantificação de citocinas, tubos com o anticoagulante Ácido Etilenodiamino Tetra-Cético (EDTA) (BD Vacutainer® EDTA K2) para os testes moleculares, e tubos com anticoagulante heparina (BD Vacutainer®), para dosagem e quantificação de sTREM-1.

4.9 Extração de DNA

A extração de DNA genômico das amostras dos três grupos foi realizada utilizando um protocolo de extração com Trizol®, conforme descrito a seguir:

Em Tubos Eppendorf de 2mL, foram adicionados 200µL de sangue total previamente homogeneizado, e em seguida, 400µL de Trizol® gelado (4°C) também foram adicionados aos tubos. Em seguida, a solução foi levada ao vórtex para ser homogeneizada até adquirir aspecto homogêneo. Em continuidade, 100µL de Clorofórmio gelado (4°C) foram adicionados a solução, e misturados no vórtex até adquirir uma coloração “cor de chocolate”. Após isso, os tubos foram submetidos a centrifugação por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Após a centrifugação, os tubos foram cuidadosamente retirados da centrifuga para verificar se a solução estava dividida em duas partes. Na sequência, a fase sobrenadante contendo o DNA genômico foi transferida cuidadosamente para Tubos Eppendorf de 1,5mL previamente identificados. Logo, 500µL de etanol 100% gelado (4°C) foram adicionados aos tubos contendo a fase sobrenadante, e em seguida os tubos foram homogeneizados em vórtex até que se observou a formação de um precipitado. O precipitado foi usualmente visualizado em 30 a 60 segundos. Após isso, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm em temperatura

ambiente, e o sobrenadante descartado. Depois, mais 500µL de etanol 100% gelado (4°C) foram adicionados aos tubos, que foram submetidos a centrifugação por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual removido com pipeta. Após isso, os tubos foram colocados em banho seco a 56°C por 10 minutos, e na sequência, 100µL de água destilada estéril foram adicionados em cada tubo (H2O_{dd}) para eluir o DNA. Dessa forma, a concentração do DNA extraído foi verificada por meio do espectrofotômetro Nanodrop modelo 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Em seguida, as amostras de DNA foram congeladas a -20°C para posterior realização de testes moleculares.

4.10 Genotipagem

A genotipagem das variantes foi realizada através da técnica de Real-Time Quantitative PCR (qPCR), utilizando sondas fluorescentes TaqMan alelo-específicas, conforme descrito na tabela abaixo, que permitem a discriminação dos SNVs estudados.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas com 1,375µL de água ultrapura, 2,5µL do genotyping Master Mix (2x), 0,125µL de ensaio TaqMan® (40x), contendo 36µM de cada primer e 8µM de cada sonda TaqMan®, 1µL de DNA genômico, com volume final de 5µL, conforme descrito na tabela abaixo. O termociclador StepOnePlus Real-Time PCR Systems foi utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse, com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos para ativação, 50 ciclos à 95°C por 15 segundos para desnaturação e 50 ciclos à 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão.

Tabela 1: Descrição das variantes, localização do genoma e sondas.

Gene	Referência da variante	Localização no genoma	Sondas*
<i>TREMI</i>	rs2234237	c.73A>T (éxon 4)	TCTTTCAGTTCATACTTTTCCTCAG[<u>A/T</u>]TAATTTAGTTGCAGCTCGGAGTTCT
	rs2234246	c.*123G>A (próx. ao éxon 2)	GTGAGACGCTGACTTTAGAAATAGC[<u>C/</u> <u>T</u>]GGTGATTACAGATTTAATTCATGTT

Legenda: *Identificação dos fluoróforos (VIC e FAM) de acordo com seu respectivo alelo. O fluoróforo VIC marca o alelo da sequência de referência (selvagem) e o FAM marca o alelo variante (mutante).

4.11 Dosagem e quantificação de citocinas por Luminex

As citocinas: IL-1β, IL-6, CXCL8, CCL3, CCL2, TNF-α e IFN-γ, envolvidas na resposta imune foram quantificadas a partir de amostras de soro através da técnica de Luminex, que utiliza beads magnéticas com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a anticorpos específicos para cada molécula a ser analisada. O kit utilizado foi o Bio-Plex ProHuman Cytokine Screening Panel, 48-Plex (Bio-Rad), seguindo o protocolo e as

recomendações do fabricante. A dosagem foi realizada no equipamento Luminex 200 System e analisada pelo software Bioplex Manager.

4.12 Dosagem e quantificação de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2 por ELISA

Os níveis séricos de sTREM-1, foram dosados a partir de amostras de soro e plasma heparinizado, através do ensaio imunoenzimático ELISA, com a utilização dos kits DuoSet-Human TREM-1 (DuoSet-Human TREM-1, DuoSet-Human Total MMP-8 e DuoSet-Human Total MMP-2, R&D System), seguindo as recomendações do fabricante.

4.13 Análises estatísticas

Os resultados encontrados foram tabulados no programa *Graphpad Prism 9.0.0.1*, o qual foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Para análise genética, foi utilizado o software R Studio e *Graphpad Prism 9.0.0.1*, para avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de estudo. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Para análise de duas variáveis, quando a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea foram utilizados testes paramétricos, como teste t não-pareado e teste t pareado. Quando a distribuição não foi considerada normal, ou seja, não foi gaussiana, foram utilizados os testes não paramétricos Mann-Whitney e o teste Wilcoxon para dados pareados. Para comparações com três ou mais de três grupos, foi utilizado o ANOVA–*One way* seguido de comparação múltipla de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido de comparação múltipla de Dunn. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$, e utilizados testes paramétricos e não paramétricos de acordo com a natureza dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 “INFLUÊNCIA DE VARIANTES NO GENE DO RECEPTOR TREM-1 NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À COVID-19”

RESUMO

A relação entre a resposta imunológica e a COVID-19 tem sido amplamente estudada, visando uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na infecção por SARS-CoV-2. Apresentamos o Receptor Desencadeante Expresso em Células Mieloides 1 (TREM1), que é regulado positivamente na inflamação e integra uma extensa família de receptores de imunoglobulinas (Ig) descoberto nos anos 2000. A ativação de TREM-1 potencializa a inflamação, e algumas variantes genéticas no gene *TREMI* têm sido estudadas e associadas com o pior prognóstico em algumas doenças. Dessa forma, avaliamos a influência de variantes no gene do receptor TREM-1 e sua associação com o perfil de mediadores solúveis, em pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes. As variantes rs2234237 e rs2234246 foram genotipados por qPCR em 138 participantes. A dosagem de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , foi realizada por meio do ensaio Luminex. A dosagem de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2 foi realizada pelo ensaio imunoenzimático ELISA, em 48 participantes. Resultados: O alelo T da variante rs2234237 principalmente em homozigotos, e genótipo C/T da variante rs22342346, contribuem para o aumento de mediadores imunológicos na população de estudo. O alelo T da variante rs2234237 principalmente em homozigotos, e genótipo C/T das variantes rs22342346, contribuem para o aumento de sTREM-1 na população de estudo. Pacientes com COVID-19, sobretudo com a forma grave, com comorbidades e que vieram a óbito apresentaram níveis elevados de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ . Convalescentes da COVID-19 apresentaram declínio nos níveis de mediadores imunológicos 30 dias após a cura clínica da infecção por SARS-CoV-2. Conclusão: Este é o primeiro estudo a investigar a relação entre variantes no gene do receptor TREM-1 e COVID-19 na Amazônia Brasileira. Em conjunto, nossos dados mostram que as variantes rs2234237 e rs2234246 não estão associadas significativamente a gravidade e/ou mortalidade na COVID-19. Novos estudos incluindo outras variantes do gene *TREMI* são necessários para um melhor entendimento sobre a atuação deste receptor no sistema imunológico e na modulação da liberação de mediadores imunológicos em resposta a infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; variantes; TREM-1; plasma convalescente; SARS-COV-2; inflamação.

INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma infecção viral que atinge inicialmente o trato respiratório dos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2, e apresenta um grande espectro de manifestações clínicas e sintomáticas, que vão desde a ausência de sintomas ao comprometimento de vários órgãos e sistemas fisiológicos. Por tratar-se de uma infecção de alta transmissibilidade, a doença levou ao colapso de vários sistemas de saúde ao redor do mundo, em virtude dos alarmantes números de infecções, internações e óbito, desde o registro do primeiro relato da doença em 2019.^{1,6,54-56}

O SARS-CoV-2, pertence à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus* e está incluso no grupo IV pela classificação de Baltimore, com genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva (ssRNA), com aproximadamente 26 a 32kb. A partícula viral é envelopada, com morfologia esférica com 100 a 160nm de diâmetro.^{15,26,54,56}

Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores TOLL (TLRs) e NOD (NLRs), estão presentes na membrana de diferentes tipos celulares, e reconhecem uma ampla variedade de moléculas que estimulam o sistema imunológico. Estes, por sua vez, contribuem efetivamente com a resposta imune inata, e nesse sentido, são capazes de desencadear sinalizações que resultam na ativação de fatores de transcrição, que regulam de forma positiva a expressão de diversos genes da resposta imune, amplificando o processo inflamatório podendo levar a danos locais ou sistêmicos.^{4,5}

Dentre os receptores, que medeiam ou regulam a resposta imune, destacamos o Receptor Desencadeante Expresso em Células Mielóides 1 (TREM-1), que é regulado positivamente na inflamação e integra uma extensa família de receptores de imunoglobulinas (Ig) descoberto nos anos 2000. Sabe-se que a ativação do receptor TREM-1 desencadeia e potencializa a inflamação, sendo que alguns polimorfismos nesse receptor têm sido estudados e associados com o pior prognóstico de algumas doenças.^{7,8,57-59} No entanto, o papel desse receptor na modulação da resposta imune e cura da COVID-19, assim como a associação de variantes no gene desse receptor na população do Amazonas, ainda não estão bem estabelecidos. Dessa forma, propomos avaliar as variantes genéticas rs2234237 e rs2234246 no gene *TREMI* e sua associação com a resposta imunológica em pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2, nos tempos de 30, 60 e 90 dias após a cura clínica da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação ética e Tipo de estudo

Este estudo foi realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM, e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob nº de parecer: 4.126.784. As amostras de controles saudáveis foram obtidas antes da pandemia de um projeto também realizado na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHMOAM, e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa sob respectivo nº de parecer: 1.982.466. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, informado antes de sua participação.

Trata-se de um estudo observacional descritivo analítico, com indivíduos convalescentes e pacientes com COVID-19, atendidos na FHMOAM e internados em enfermaria ou UTI do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV), que anuiu sua participação ao estudo, respectivamente.

Desenho do estudo e população

A população do estudo é formada por três grupos, compostos por indivíduos adultos, ambos os sexos, conforme os seguintes critérios de inclusão e exclusão: 50 candidatos a doadores de sangue, com mais de três doações e que não tiveram contato com o SARS-COV-2, e que encontravam-se aptos aptos nas triagens clínica, hematológica, sorológica e molecular conforme portaria de consolidação 5 do Ministério da Saúde (2017); 36 pacientes internados em enfermaria ou UTI do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) com diagnóstico molecular por RT-PCR positivo para COVID-19; e 52 indivíduos convalescentes da COVID-19, recrutados pela FHMOAM entre julho e dezembro de 2020, que apresentaram ou não comprometimento clínico com internação durante o curso da doença, que apresentaram aptidão nas triagens clínica, hematológica, sorológica e molecular conforme portaria de consolidação nº 5 do Ministério da Saúde do Brasil (2017).

Coleta das amostras

De um total de 138 indivíduos participantes, foram coletadas aproximadamente 5 ml de sangue periférico por punção venosa, em tubos com sistema a vácuo contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2) para testes moleculares, gel separador (Gel BD SST® II Advance®) para dosagem de mediadores solúveis, e anticoagulante heparina (BD Vacutainer®) para dosagem de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2. Para os doadores de plasma convalescente, as coletas foram feitas 30, 60 e 90 dias após teste molecular confirmatório da COVID-19.

A genotipagem e dosagem de mediadores solúveis foi realizada a partir de amostras de sangue periférico coletadas em tubos com heparina e EDTA, de 50 indivíduos controles, 36 pacientes com COVID-19 e 52 doadores de plasma convalescente (n=138). Para dosagem de MMP-8 e MMP-2 foram utilizadas amostras de plasma coletadas em tubos com heparina de 16 controles, 17 pacientes com COVID-19 e 15 doadores de plasma convalescente (n=48) selecionados de forma aleatória.

Extração de DNA

A extração de DNA genômico das amostras dos três grupos foi realizada a partir de amostras de sangue total utilizando-se o Kit Brazol®, conforme as orientações do fabricante.

Genotipagem

A genotipagem das variantes foi realizada pela técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR), em microplacas de 96 poços com 1,375 µL de água ultra pura, 2,5 µL de Master Mix (1x), 0,125 µL de ensaio TaqMan® (1x) e 1 µL de DNA genômico, com volume final de 5 µL. O Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Thermocycler da Thermofisher Scientific Biosystems foi usado para amplificar as sequências de interesse e discriminação alélica sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min para ativação; 50 ciclos a 92°C por 15s para desnaturação; e 50 ciclos a 60°C por 90 s para anelamento e extensão.

Dosagem de mediadores imunológicos

Os níveis séricos de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, foram dosados pela técnica de Luminex, com o kit Bio-Plex ProHuman Cytokine Screening Panel, 27-Plex (Bio-Rad), conforme orientações do fabricante. Os dados foram adquiridos através do software Bioplex Manager. Os níveis séricos de sTREM-1, MMP-8 e MMP-2, foram medidos no plasma usando um kit ELISA (DuoSet-Human TREM-1, DuoSet-Human Total MMP-2 e DuoSet-Human Total MMP-8, R&D System) de acordo com as especificações do fabricante.

Análise de dados

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais foram apresentados em tabelas e gráficos, elaborados no programa Excel (Microsoft Corporation). As variáveis categóricas são expressas em valor absoluto (n) e frequência relativa (%). O software *GraphPad Prism* (versão 9.0.1) foi utilizado para a análise estatística entre grupos. A análise entre grupos independentes foi realizada pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas e teste t de Student, teste de Mann-Whitney ou ANOVA para variáveis contínuas.

Os softwares R Studio e *GraphPad Prism* (versão 9.0.0) equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), foram utilizados para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de estudo.

RESULTADOS

Foram analisados os dados clínicos e demográficos de 138 participantes do estudo, sendo: 50 indivíduos controles, 36 pacientes com COVID-19 e 52 indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2.

Características demográficas, clínicas e hematológicas da população de estudo

Os dados foram representados por mediana \pm IQR (Intervalo Interquartil), desse modo, a mediana da idade do grupo controle foi 29,50 (22,75-41,50), a de pacientes com COVID-19 foi 44,50 (33,50-49,50), e no grupo de indivíduos convalescentes foi 40,00 (30,00-50,75). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre grupo controle e pacientes com COVID-19 ($p < 0,0001$), e na comparação grupo controle com indivíduos convalescentes ($p = 0,0039$), como ilustrado na tabela abaixo. O sexo masculino foi predominante em todos os três grupos: 74% no grupo controle, 61,11% no grupo de pacientes com COVID-19 e 78,85% no grupo dos indivíduos convalescentes.

Tabela 1: Características demográficas e parâmetros hematológicos da população em estudo.

	Controles (N=50)	COVID-19 (N=36)	Convalescentes (N=52)			Valor de <i>p</i>
			D30	D60	D90	
Características demográficas						
Idade, mediana, (IQR)	29,50 (22,75-41,50)	44,50 (33,50-49,50)		40,00 (30,00-50,75)		^a <0,0001 ^b 0,0039 ^c 0,3057
Sexo, N (%)						
Masculino	37 (74%)	22 (61,11%)		41 (78,85%)		0,1785
Feminino	13 (26%)	14 (38,89%)		11 (21,15%)		
Dados Laboratoriais, mediana, (IQR)						
RBC (x 10 ⁶ /μL)	6,34 (5,15-7,05)	7,54 (5,74-10,21)	6,87 (5,89-7,46)	6,23 (5,75-7,11)	6,48 (5,76-7,80)	^a <0,0001 ^b 0,4499 ^c 0,0249 ^d 0,4807 ^e 0,0040 ^f 0,0867 ^g 0,0036
Hemoglobina (g/dL)	14,95 (13,95-16,03)	12,20 (9,72-14,68)	14,25 (13,33-15,00)	14,05 (13,03-14,80)	14,24 (13,20-14,98)	^a <0,0001 ^b 0,0582 ^c 0,0010 ^d 0,0178 ^e 0,0153 ^f 0,3350 ^g 0,0458
Hematócrito (%)	44,90 (41,15-47,48)	36,40 (29,00-43-58)	42,45 (40,35-45,25)	41,55 (38,45-44,40)	43,07 (39,85-45,55)	^a <0,0001 ^b 0,2642 ^c 0,0083

						^d 0,6649 ^e 0,0456 ^f 0,7011 ^g 0,0143
VCM (fL)	87,85 (84,35-90,43)	89,50 (85,55-93,23)	88,25 (84,95-91,45)	88,50 (85,95-91,65)	89,50 (85,23-91,70)	a, b, c, d, e, f, ^g >0,05
HCM (pg)	29,75 (28,75-30,73)	29,40 (28,03-30,55)	29,80 (28,70-30,68)	30,00 (28,60-30,78)	29,65 (27,93-30,80)	a, b, c, d, e, f, ^g >0,05
CHCM (g/dL)	34,00 (33,05-34,63)	32,40 (32,03-33,30)	33,40 (32,70-34,35)	33,54 (32,70-34,30)	33,45 (32,62-34,20)	^a < 0,0001 ^b >0,9999 ^c >0,9999 ^d >0,9999 ^e 0,0055 ^f 0,0049 ^g 0,0088
WBC (x 10 ³ /μL)	6,34 (5,15-7,05)	7,54 (5,74-10,21)	6,87 (5,89-7,46)	6,23 (5,75-7,11)	6,48 (5,76-7,80)	^a 0,0690 ^b 0,6513 ^c >0,9999 ^d >0,9999 ^e >0,9999 ^f 0,1709 ^g >0,9999
Neutrófilos (x 10 ³ /μL)	3,38 (2,80-4,27)	5,28 (3,32-7,98)	3,99 (3,20-4,53)	3,68 (3,14-4,21)	3,77 (3,17-4,41)	^a 0,0004 ^b 0,3126 ^c >0,9999 ^d 0,9953 ^e 0,2583 ^f 0,0087 ^g 0,0727
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	1,84 (1,57-2,20)	1,40 (0,95-2,13)	2,00 (1,68-2,27)	1,96 (1,59-2,37)	1,98 (1,58-2,30)	^a 0,1719 ^b >0,9999 ^c >0,9999

						^d >0,9999 ^e 0,0040 ^f 0,0080 ^g 0,0128
						^a 0,0082 ^b 0,0917 ^c >0,9999
Monócitos (x 10 ³ /μL)	0,38 (0,28-0,42)	0,46 (0,37-0,55)	0,42 (0,35-0,47)	0,35 (0,31-0,40)	0,37 (0,28-0,43)	^d >0,9999 ^e >0,9999 ^f 0,0019 ^g 0,0054
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	245,5 (216,0-284,0)	215,0 (154,8-347,3)	248,0 (199,8-284,5)	240,0 (214,8-258,5)	242,5 (206,5-267,8)	^{a, b, c, d, e, f,} ^g >0,05

Legenda: Abreviações: SD: Desvio Padrão; os dados estão apresentados como intervalo interquartil (IQR), (%), ou n/N. ^aControle vs COVID-19; ^bControle vs Convalescentes D30; ^cControle vs Convalescentes D60; ^dControle vs Convalescentes D90; ^eCOVID-19 vs Convalescentes D30; ^fCOVID-19 vs Convalescentes D60; ^gCOVID-19 vs Convalescentes D90; Os dados foram comparados usando o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher para variáveis categóricas e análise de variância (ANOVA) pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn's para múltiplas comparações, e teste t não paramétrico de Mann-Whitney, foram usados para variáveis contínuas. p <0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

A tabela 2 descreve as principais características dos pacientes com COVID-19, como comorbidades, no grupo de pacientes com COVID-19 18 (50,00%) pacientes possuíam alguma comorbidade e 18 (50,00%) não possuíam comorbidades. Dentre as comorbidades existentes, diabetes (55,55%) e hipertensão (55,55%) foram as mais frequentes.

Outras comorbidades também foram relatadas como, Insuficiência Renal Aguda, Leucemia, Osteoporose, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Tumor cerebral e Macroadenoma Hipofisário. Em relação ao uso de medicamentos, ainda no grupo de pacientes com COVID-19, 9 (25,00%) fizeram uso de algum medicamento e 27 (75,00%) não fizeram uso de nenhuma medicação.

Os dados de internação, mostram que 19 (52,78%) dos pacientes com COVID-19, foram hospitalizados. Destes, 3 (8,33%) foram internados em leitos de enfermaria e 16 (44,44%) em leitos de UTI. Ainda, por conta da falta de critérios clínicos e laboratoriais que possibilitassem uma melhor classificação de acordo com a gravidade clínica desses pacientes, estes por sua vez, foram classificados em grave e não grave com base em alguns dados e informações (uso de ventilação mecânica, internação em UTI ou enfermaria e desfecho clínico) relatados nos prontuários eletrônicos obtidos e estabelecidos pela equipe médica do HUGV. Desse modo, 15 (41,67%) foram classificados como grave e 21 (58,33%) como não grave. Sobre uso de suporte respiratório, dos 19 pacientes internados, 14 (38,86%) fizeram uso de suporte respiratório como ventilação mecânica. Com relação ao desfecho, dos pacientes internados, 12 (63,16%) pacientes obtiveram alta e 7 (36,84%) vieram a óbito.

Tabela 2: Características clínicas dos pacientes com COVID-19.

	COVID-19 (N=36)
Comorbidades, N (%)	
Sim	18 (50,00%)
Diabetes mellitus	10 (55,55%)
Hipertensão	10 (55,55%)
Outras Comorbidades	10 (55,55%)
Não	18 (50,00%)
Uso de medicamentos, N (%)	

Sim	9 (25,00%)
Não	27 (75,00%)
Gravidade Clínica, N (%)	
Grave	15 (41,67%)
Não Grave	21 (58,33%)
Hospitalização, N (%)	
Sim	19 (52,78%)
Não	17 (47,22%)
Internação, N (%)	
UTI	16 (44,44%)
Enfermaria	3 (8,33%)
Não Internados	17 (47,22%)
Suporte Respiratório, N (%)	
Sim	14 (38,89%)
Não	22 (61,11%)
Desfecho, N (%)	
Alta	12 (63,16%)
Óbito	7 (36,84%)

Genótipos e frequências alélicas das variantes rs2234237 e rs2234246 do gene *TREMI*

A frequência genotípica e alélica dos SNVs estudados estão descritos na tabela abaixo, no entanto, não houveram diferenças estatisticamente significantes nas comparações. O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aplicado, e ambas as variantes se encontravam em equilíbrio. Por conta no N amostral, não foi possível realizar análise do equilíbrio ajustada por variáveis como, sexo e idade.

As frequências também foram analisadas e para a variantes rs2234237, o genótipo T/T foi o mais frequente em ambos os grupos controle e pacientes com COVID-19, apesar do valor de p não ser estatisticamente significante, e em ambos os grupos o alelo T também foi o mais frequente. Para a variante rs2234246, o genótipo C/T foi o mais frequente em ambos os grupos, e o alelo C foi o alelo mais frequente no grupo de pacientes com COVID-19, e o T foi o alelo mais frequente no grupo controle.

Tabela 3: Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos no gene *TREMI* em pacientes com COVID-19 e indivíduos controles

Polimorfismo, Genótipo ou Alelo	Grupo Controle	COVID-19	OR (CI 95 %)	Valor de p	Comparações
rs2234237 A/T					
	(N=45)	(N=34)			
A/A	-	-	-	-	A/A vs A/T + T/T
A/T	10 (22,22%)	10(29,41%)	0,00 (0,000 - 9,900)	>0,9999	A/A vs A/T
T/T	35 (77,78%)	23 (65,57%)	0,00 (0,000 - 6,171)	0,4068	A/A vs T/T
A	10 (11,11%)	12 (17,65%)	0,5833 (0,2302 - 1,384)	0,2552	
T	80 (88,89%)	56 (82,35%)			
rs2234246 C/T					
	(N=42)	(N=35)	OR (CI 95 %)	Valor de p	Comparações
C/C	7 (16,67%)	13 (37,14%)	0,3385 (0,1274 - 1,028)	0,0665	C/C vs C/T + T/T
C/T	26 (61,90%)	15 (42,86%)	0,3107 (0,1061 - 0,9104)	0,0553	C/C vs C/T
T/T	9 (21,43%)	7 (20,00%)	0,4188 (0,1208 - 1,653)	0,3128	C/C vs T/T
C	40 (47,62%)	41 (58,57%)	0,6430 (0,3343 - 1,209)	0,1971	
T	44 (52,38%)	29 (41,43%)			

Legenda: OR: razão de chances. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Exato de Fisher e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Modelos genéticos: Dominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem com heterocigoto + homocigoto para alelo polimórfico. Codominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + heterocigoto. Recessivo: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + homocigoto para alelo variante.

As frequências também foram analisadas de acordo com a classificação de gravidade dos pacientes com COVID-19, e para a variantes rs2234237, o genótipo T/T foi o mais frequente em ambos os grupos, apesar do valor de p não ser estatisticamente significante, e em ambos os grupos o alelo T também foi o mais frequente. Para a variante rs2234246, o genótipo

C/C foi o mais frequente no grupo grave e o genótipo C/T foi o mais frequente no grupo não grave. Já o alelo C, foi o mais frequente em ambos os grupos.

Tabela 4: Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos no gene *TREMI* em pacientes com COVID-19 estratificados em grave e não grave.

Polimorfismo, Genótipo ou Alelo	Grave	Não Grave	OR (CI 95 %)	Valor de <i>p</i>	Comparações
rs2234237 A/T	(N=14)	(N=20)			
A/A	1 (7,14%)	-	-	-	A/A vs A/T + T/T
A/T	5 (35,71%)	5 (25,00%)	- (0,09259-)	>0,9999	A/A vs A/T
T/T	8 (57,14%)	15 (75,00%)	- (0,1852-)	0,3750	A/A vs T/T
A	7 (25%)	5 (12,5%)	2,333 (0,6606- 7,615)	0,2106	
T	21 (75%)	35 (87,5%)			
rs2234246 C/T	(N=15)	(N=20)	OR (CI 95 %)	Valor de <i>p</i>	Comparações
C/C	7 (46,67%)	6 (30,00%)	2,042 (0,5270- 7,719)	0,4810	C/C vs C/T + T/T
C/T	6 (40,00%)	9 (45,00%)	1,750 (0,4156- 8,487)	0,7051	C/C vs C/T
T/T	2 (13,33%)	5 (25,00%)	2,917 (0,4855- 17,91)	0,3742	C/C vs T/T
C	20 (66,67%)	21 (52,5%)	1,810 (0,6888- 4,574)	0,3273	
T	10 (33,33%)	19 (47,5%)			

Legenda: OR: razão de chances. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Exato de Fisher e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Modelos genéticos: Dominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem com heterocigoto + homocigoto para alelo polimórfico. Codominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + heterocigoto. Recessivo: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + homocigoto para alelo variante.

Ainda, a frequência também foi avaliada acordo com o desfecho clínico dos pacientes com COVID-19, e para a variantes rs2234237, o genótipo T/T foi o mais frequente em ambos os grupos, apesar do valor de *p* não ser estatisticamente significativo, e em ambos os grupos o alelo T também foi o mais frequente.

Para a variante rs2234246, o genótipo C/C foi o mais frequente no grupo alta, e o genótipo C/T foi o mais frequente no grupo óbito. O alelo C foi o mais frequente no grupo alta, e no grupo óbito ambos os alelos foram igualmente frequentes. No entanto, o valor de *p* não tenha sido estatisticamente significativo.

Tabela 5: Frequência dos alelos e genótipos dos polimorfismos no gene *TREM1* em pacientes com COVID-19 estratificados de acordo com o desfecho clínico em alta e óbito.

Polimorfismo, Genótipo ou Alelo	Alta	Óbito	OR (CI 95 %)	Valor de <i>p</i>	Comparações
rs2234237 A/T	(N=12)	(N=6)			
A/A	1 (8,33%)	-	-	-	A/A vs A/T + T/T
A/T	5 (41,67%)	2 (33,33%)	- (0,03704 -)	>0,9999	A/A vs A/T
T/T	6 (50,00%)	4 (66,67%)	- (0,06349 -)	>0,9999	A/A vs T/T
A	7 (29,17%)	2 (16,67%)	2,059 (0,3946- 11,11)	0,6855	
T	17 (70,83%)	10 (83,33%)			
rs2234246 C/T	(N=12)	(N=6)	OR (CI 95 %)	Valor de <i>p</i>	Comparações
C/C	6 (50,00%)	2 (33,33%)	2,500 (0,3928- 15,72)	0,6332	C/C vs C/T + T/T
C/T	5 (41,67%)	3 (50,00%)	1,800 (0,2642- 12,87)	>0,9999	C/C vs C/T
T/T	1 (8,33%)	2 (33,33%)	6,000 (0,4125- 98,57)	0,4909	C/C vs T/T
C	17 (70,83%)	7 (50,00%)	2,429 (0,5556- 8,609)	0,2979	
T	7 (29,17%)	7 (50,00%)			

Legenda: OR: razão de chances. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Exato de Fisher e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Modelos genéticos: Dominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem com heterocigoto + homocigoto para alelo polimórfico. Codominante: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + heterocigoto. Recessivo: comparação de frequência homocigota para alelo selvagem + homocigoto para alelo variante.

Influência das variantes rs2234237 e rs2234246 nos níveis de sTREM-1 na população de estudo

A fim de avaliar a possível influência dos SNVs estudados sobre os níveis séricos de sTREM-1, analisamos os níveis séricos de sTREM-1 por genótipo de cada variante estudada. Observamos que para a variantes rs2234237, o alelo T, principalmente em homocigose, parece favorecer o aumento de sTREM-1 em todos os grupos estudados. Ao passo que, para a variante rs2234246, observamos que no grupo dos controles, o alelo T especialmente em homocigose, parece favorecer o aumento de sTREM-1. Entretanto, no grupo de pacientes com COVID-19 e no grupo de indivíduos convalescentes, observamos que o alelo C aparentemente favorece o aumento nos níveis séricos de sTREM-1.

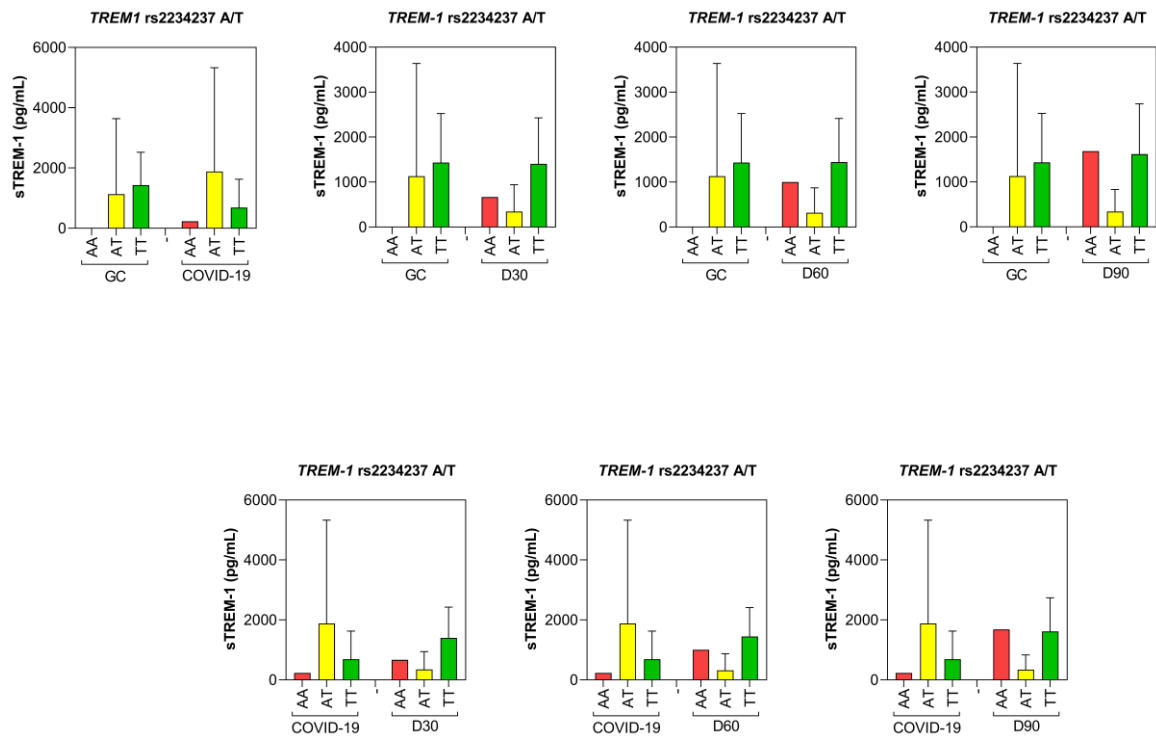


Figura 1: Avaliação da influência da variante rs2234237 A/T sobre níveis séricos de sTREM-1 em controles saudáveis, pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2. O gráfico acima ilustra a média + IC (intervalo de confiança) de 95% do valor sérico de sTREM-1, avaliado conforme os genótipos dos grupos estudados. GC (grupo controle). D30, D60 e D90 (indivíduos convalescentes, nos diferentes tempos de acompanhamento). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ■ Refere-se ao genótipo AA, ■ ao genótipo AT e ■ ao genótipo TT.

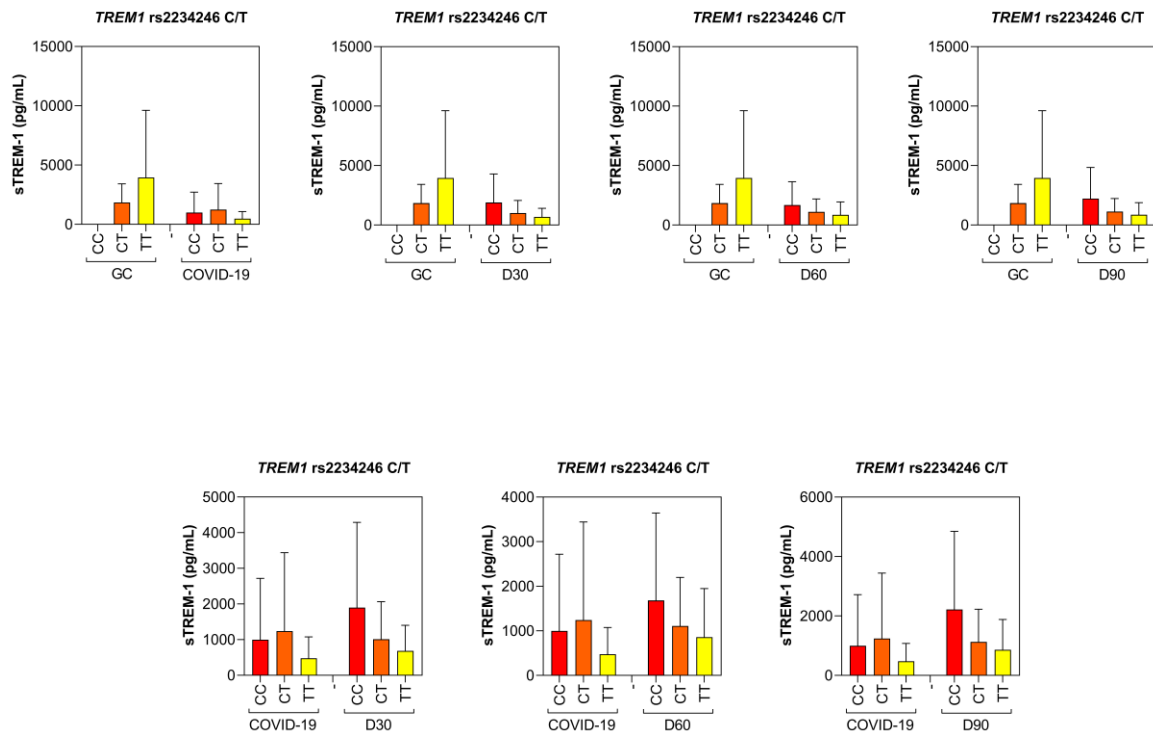


Figura 2: Avaliação da influência da variante rs2234246 C/T sobre níveis séricos de sTREM-1 em controles saudáveis, pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2. Os gráficos acima ilustram a média + IC (intervalo de confiança) de 95% do valor sérico de sTREM-1, avaliado conforme os genótipos dos grupos estudados. GC (grupo controle). D30, D60 e D90 (indivíduos convalescentes, nos diferentes tempos de acompanhamento). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ■ Refere-se ao genótipo CC, ■ refere-se ao genótipo CT e ■ ao genótipo TT.

Outro achado em nosso estudo, refere-se ainda aos níveis de sTREM-1, onde conseguimos observar que no grupo controle e no grupo de indivíduos convalescentes da COVID-19, verificamos que 58% e 46,1% desses indivíduos não produzem sTREM-1, ou não tiveram a molécula detectada, respectivamente.

Curiosamente, 75% dos participantes no grupo controle que não tiveram sTREM-1 detectável pela técnica de Elisa são homocigotos para o alelo T especificamente para a variante rs2234237. Já no grupo de indivíduos convalescentes, ainda analisando a mesma variante, 66,7% também são homocigotos para o alelo T.

Influência das variantes rs2234237 e rs2234246 nos níveis séricos de mediadores solúveis na população de estudo

Foram avaliados os possíveis efeitos das variantes estudadas nos níveis de CXCL8, CCL3, CCL2, IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Nossos resultados mostraram que somente para IL-1 β houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupo controle e pacientes com COVID-19 ($p < 0,05$). Entretanto, para todos estes mediadores solúveis analisados, o alelo T (homocigotos ou heterocigotos), demonstra ser o alelo que favorece o

aumento da secreção desses mediadores, tanto em controles saudáveis quanto em pacientes com COVID-19.

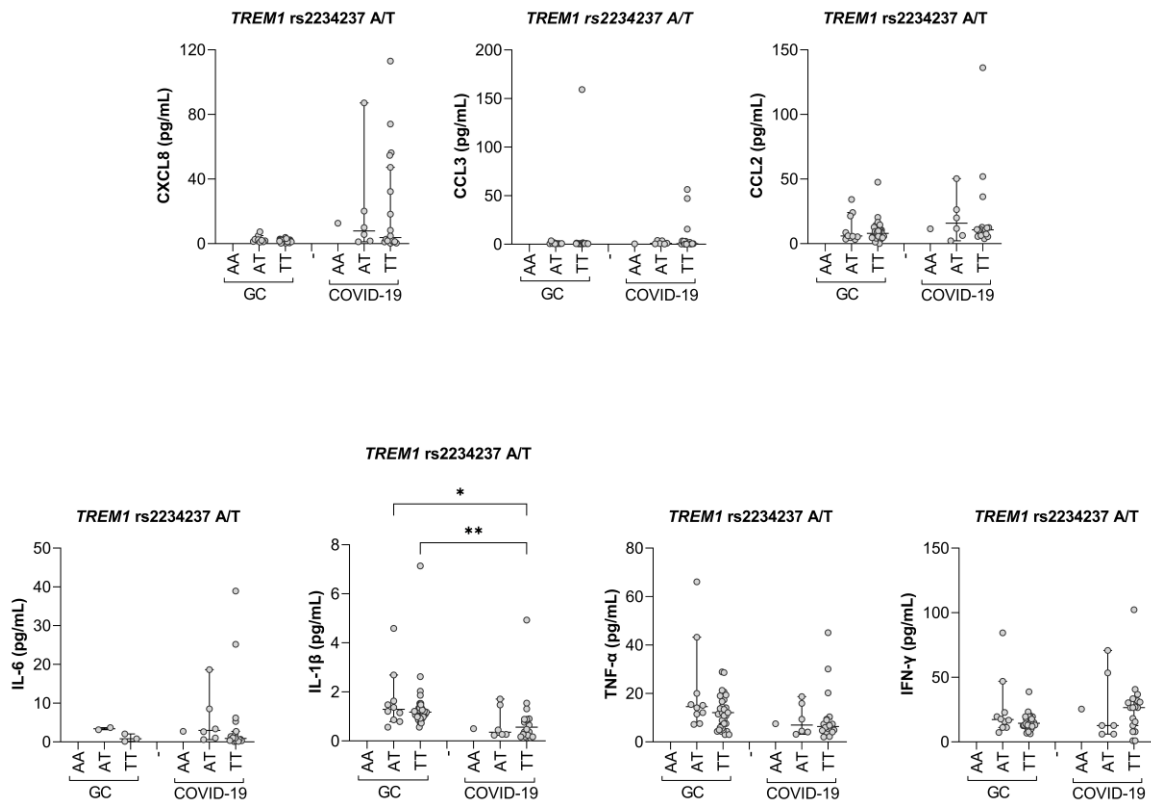


Figura 3: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234237 A/T sobre níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis, pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes da COVID-19. Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variante rs2234237 A/T no grupo controle (GC) e COVID-19. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Em continuidade, foi avaliada a influência das variantes rs2234237 nos indivíduos convalescentes da COVID-19 nos diferentes tempos de acompanhamento (D30, D60 e D90), e diferentemente do que foi demonstrado na comparação entre grupo controle e pacientes com COVID-19, nossos resultados mostram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em CCL3, IL-1 β , TNF- α no tempo D30, CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α no tempo D60, e D90.

Por conseguinte, assim como demonstrado anteriormente, para esta variante o alelo T sobretudo em homozigose, aparenta ser o alelo responsável por aumento na secreção de quimiocinas e citocinas na comparação entre grupo controle e indivíduos convalescentes. Até

o momento não há estudo publicados avaliando os efeitos dessas variantes na concentração sérica de mediadores solúveis na COVID-19.

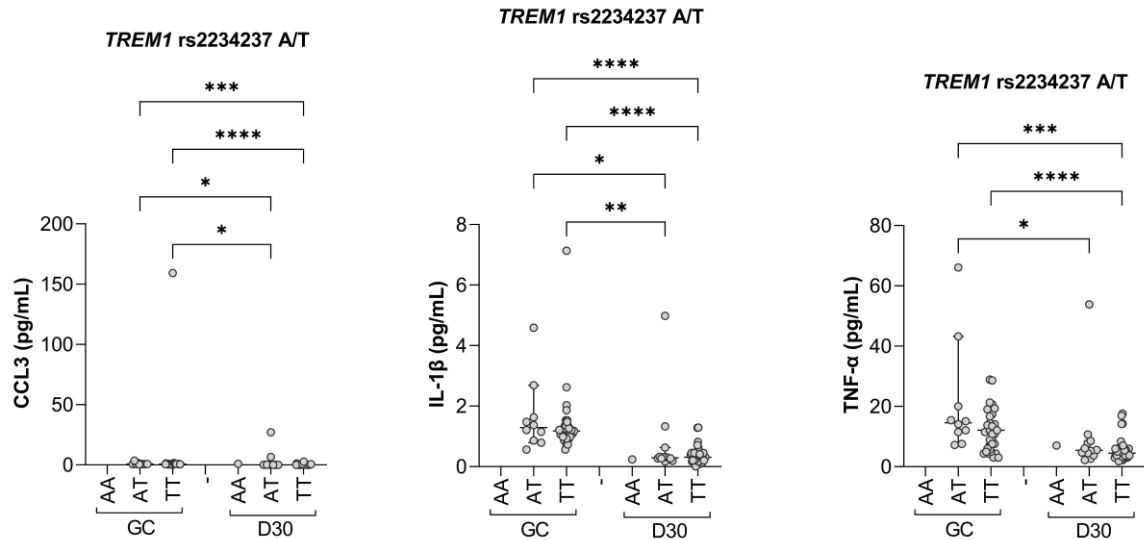


Figura 4: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234237 A/T sobre níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19. Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234237 A/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D30). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

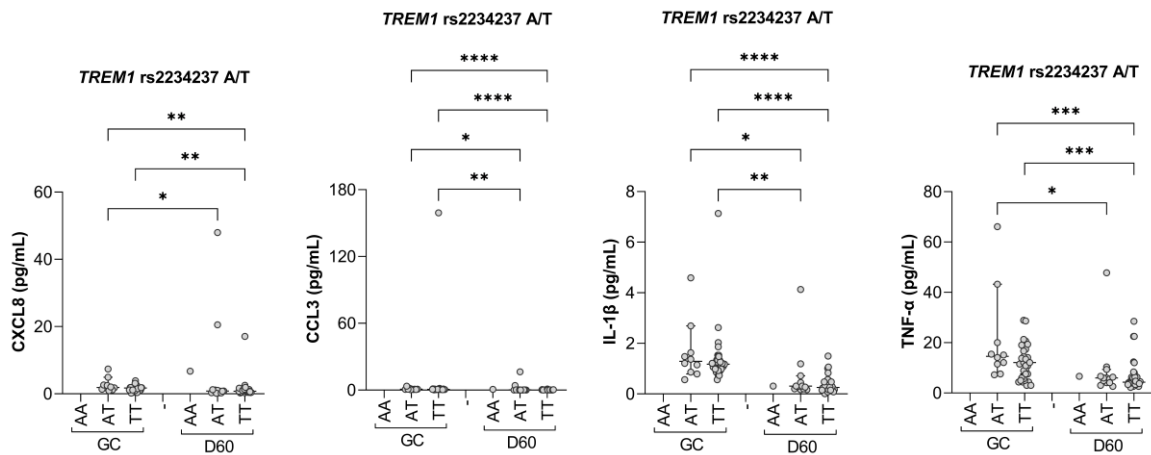


Figura 5: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234237 A/T sobre níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19. Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234237 A/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D60). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

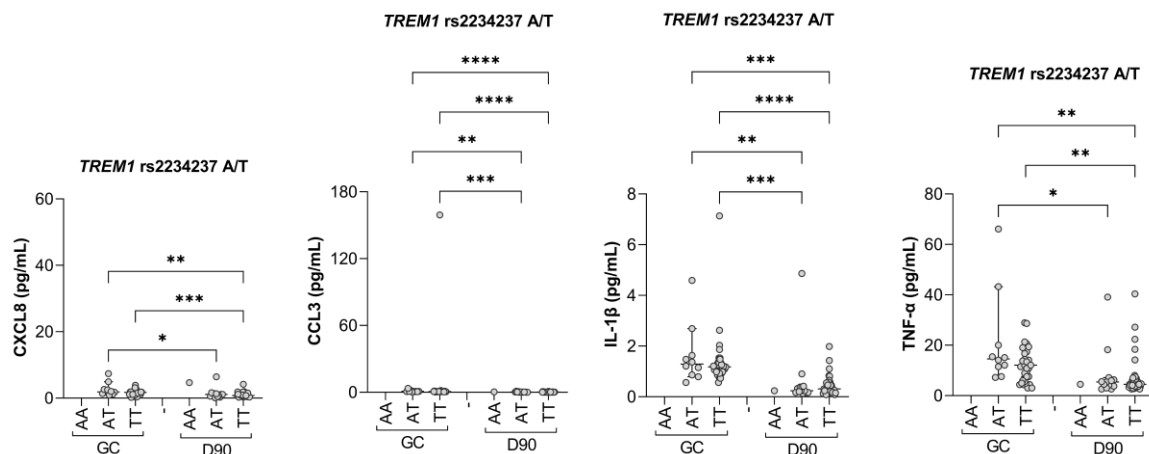


Figura 6: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234237 A/T sobre níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19. Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234237 A/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D90). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Além disso, foi avaliada a influência da variante rs2234246 C/T nos níveis séricos de mediadores solúveis na população de estudo, e para isso, analisamos a influência dos genótipos da variante rs2234246 tomando como base a concentração de quimiocinas e citocinas da população de estudo.

Dessa forma, encontramos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os genótipos versus concentração de mediadores, na comparação grupo controle versus pacientes com COVID-19, para os níveis de CXCL8 e IL-1 β . Nossos resultados mostram que indivíduos com alelo T, tanto heterozigotos como homozigotos do grupo controle, apresentam níveis mais elevados de CXCL8 e IL-1 β quando comparados aos mesmos genótipos dos pacientes com COVID-19.

Além disso, também podemos observar que aparentemente, o genótipo C/T, aparenta ser o genótipo que favorece o aumento na concentração sérica de mediadores solúveis tanto no grupo controle quanto em pacientes com COVID-19.

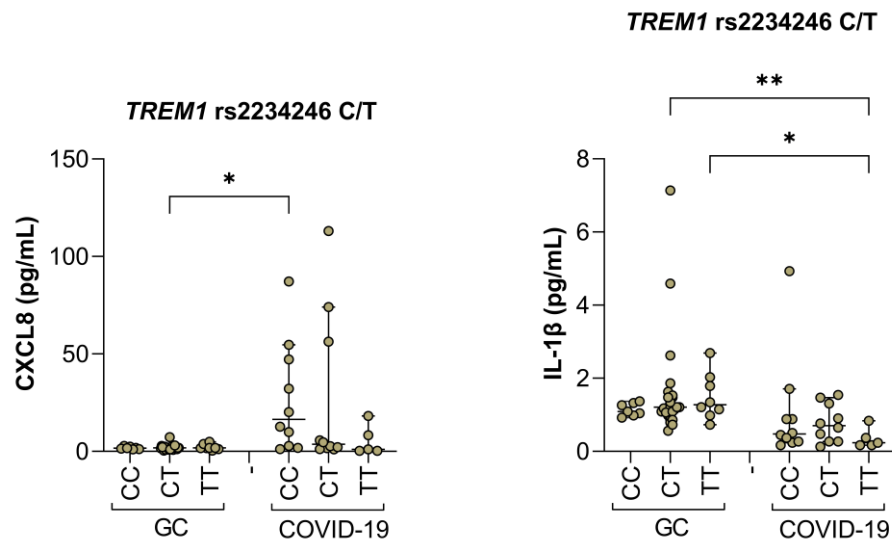


Figura 7: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234246 C/T sobre níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e pacientes com COVID-19. Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234246 C/T no grupo controle (GC) e pacientes com COVID-19. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Por conseguinte, também avaliamos a concentração de mediadores solúveis por genótipo para a variantes rs2234246, analisando os genótipos versus concentração de mediadores, comparando grupo controle versus convalescentes da COVID-19 no tempo D30, como ilustra a figura 8.

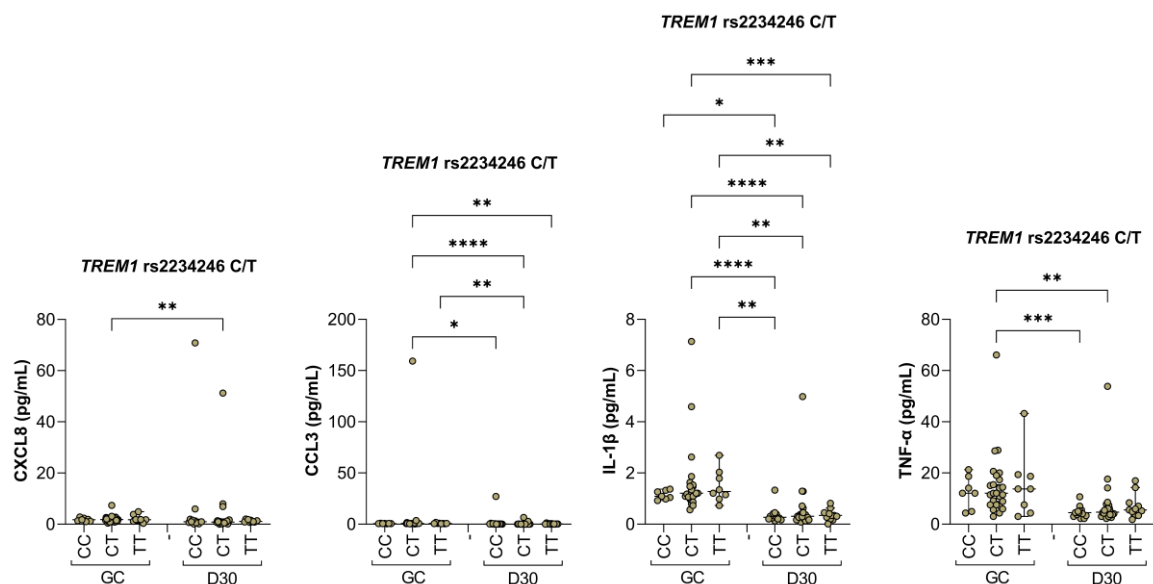


Figura 8: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234246 C/T sobre níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D30). Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234246 C/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D30). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Nesse sentido, observamos que indivíduos do grupo controle com o genótipo C/C, apresentaram níveis elevados de quando comparados a indivíduos convalescentes com genótipo C/C. Controles saudáveis com genótipo C/T, apresentaram níveis elevados de CXCL8, quando comparados aos convalescentes com os genótipos C/T, níveis elevados de CCL3 quando comparados aos convalescentes com os genótipos C/T e T/T, níveis elevados de IL-1 β quando comparados a convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T, e níveis aumentados de TNF- α , quando comparados aos genótipos C/C e C/T de indivíduos convalescentes. Ainda, controles com genótipo T/T apresentaram níveis elevados de CCL3 quando comparados a indivíduos convalescentes com genótipo C/T, e níveis aumentados de IL-1 β , quando comparados a convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T.

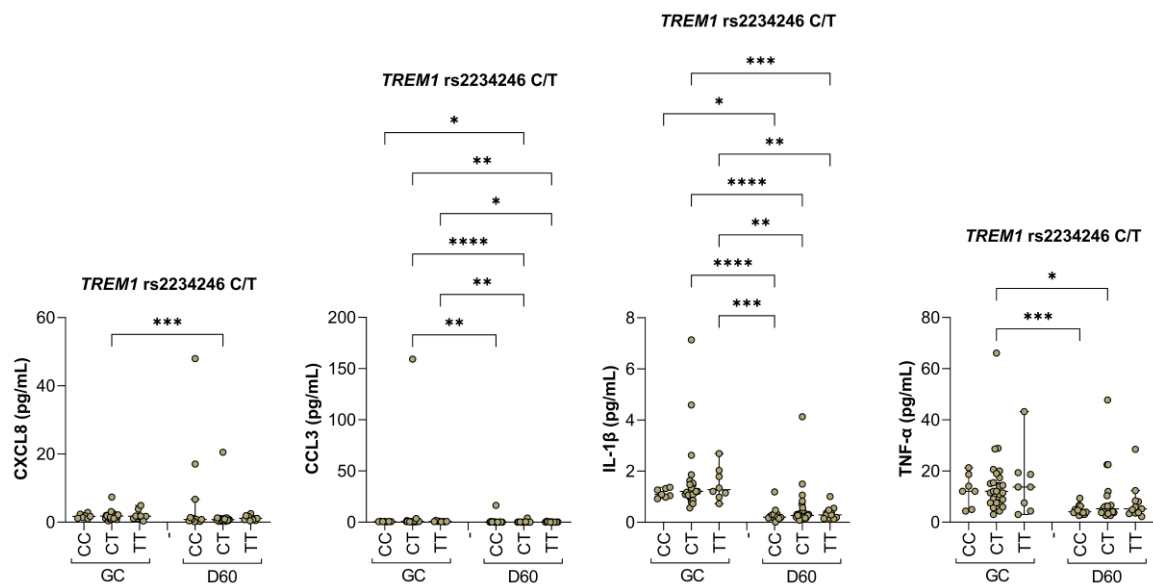


Figura 9: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234246 C/T sobre níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D60). Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234246 C/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D60). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Avaliamos ainda os efeitos da variante rs2234246 C/T sob os níveis de mediadores solúveis, comparando grupo controle versus convalescentes no tempo D60. Por conseguinte, no grupo controle, indivíduos com genótipo C/C apresentaram níveis elevados de CCL3, quando comparados a indivíduos convalescentes com genótipo C/T. Indivíduos com genótipo C/T, apresentaram níveis aumentados de CXCL8, quando comparados a convalescentes com genótipo C/T, níveis aumentados de CCL3, quando comparados a convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T, níveis elevados de IL-1 β , em comparação a indivíduos convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T, e por fim, níveis mais altos de TNF- α , quando comparados a indivíduos convalescentes com genótipo C/C e C/T.

Ainda, controles com genótipo T/T, apresentaram níveis mais altos de CCL3, em comparação a convalescentes com genótipo C/T e T/T, e níveis elevados de IL-1 β , em comparação a indivíduos convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T.

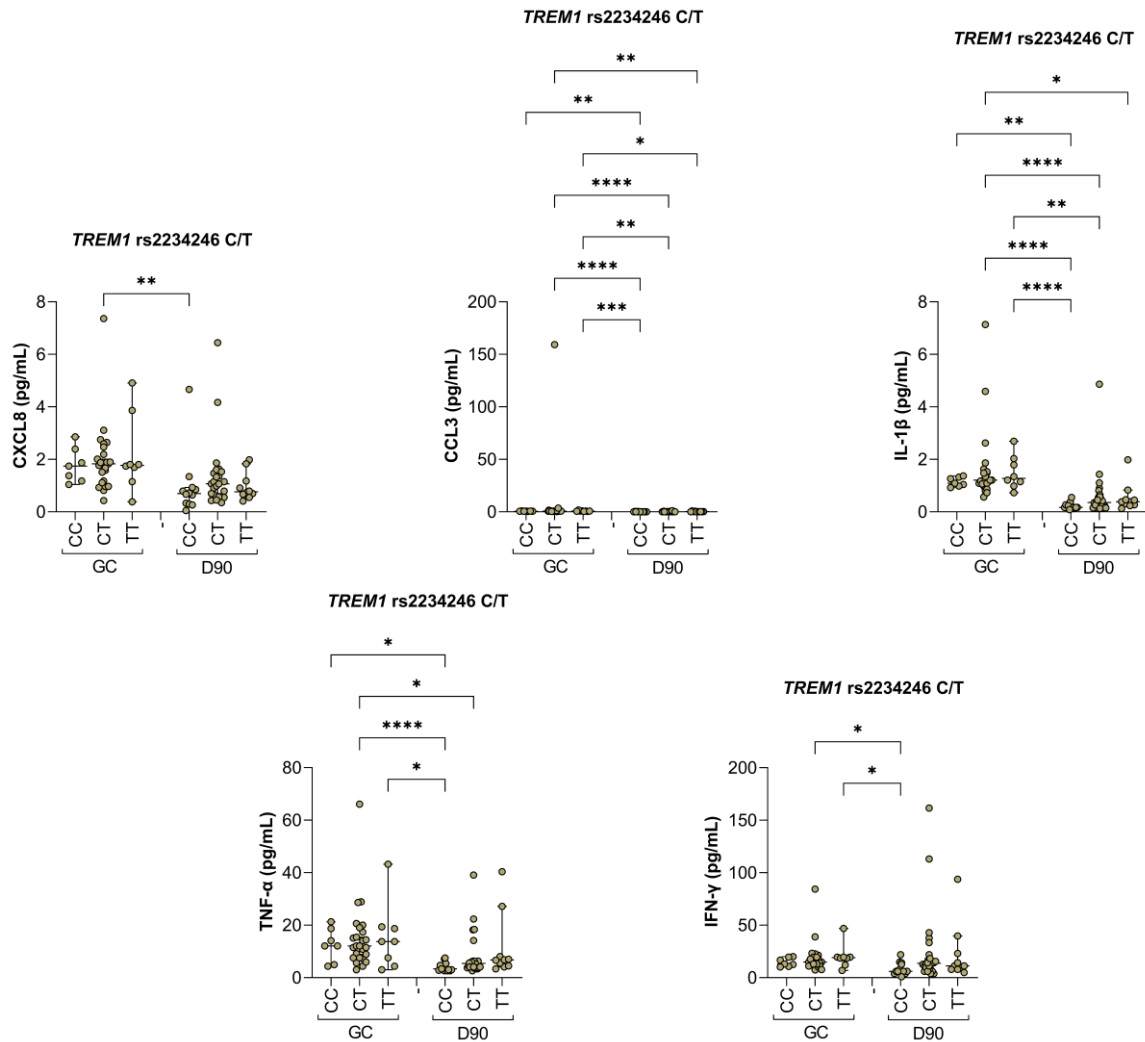


Figura 10: Avaliação da influência dos genótipos da variante rs2234246 C/T sobre níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D90). Os gráficos acima ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL, distribuídos conforme os genótipos da variantes rs2234246 C/T no grupo controle (GC) e indivíduos convalescentes da COVID-19 (D90). As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Ademais, também avaliamos a influência dos genótipos do SNV rs2234246 C/T sob os níveis de quimiocinas e citocinas, dessa vez comparando grupo controle versus indivíduos convalescentes no tempo D90.

Logo, indivíduos controles com genótipo C/C, apresentaram níveis elevados de CCL3, IL-1 β e TNF- α , em comparação a convalescentes com genótipo C/C. Por sua vez, controles saudáveis com genótipo C/T, possuíam níveis aumentados de CXCL8, quando comparados a convalescentes com genótipo C/C, níveis aumentados de CCL3, em comparação a indivíduos

convalescentes com genótipos C/C, C/T e T/T, níveis mais altos de IL-1 β , em comparação a convalescentes com genótipos C/C, C/T e T/T, níveis mais altos de TNF- α , em comparação a convalescentes com genótipo C/C e C/T, e níveis aumentados de IFN- γ , em comparação aos convalescentes que apresentaram genótipo C/C.

Os indivíduos controles com genótipo T/T, por sua vez, apresentaram altos níveis de CCL3, em comparação a convalescentes com genótipo C/C, C/T e T/T, níveis aumentados de IL-1 β , em comparação a convalescentes com genótipo C/C e C/T, e níveis aumentados de TNF- α e IFN- γ , quando comparados a convalescentes com genótipo C/C.

Análise do perfil de mediadores solúveis da população de estudo

Com o intuito de avaliar o perfil de resposta imunológica dos pacientes com COVID-19, verificamos os níveis séricos de 7 mediadores solúveis, descritos como principais moléculas envolvidas na resposta imune a infecção por SARS-CoV-2, e associadas a ativação do receptor TREM-1. Ainda, incluímos nesta análise, sTREM-1, MMP-8 e MMP-2, avaliando os níveis séricos desses mediadores imunológicos, através da comparação entre pacientes com COVID-19 versus grupo controle, e observamos diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos, para os níveis de CXCL8 e MMP-8.

Apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significantes na comparação com o grupo controle, notamos que pacientes com COVID-19 apresentaram níveis elevados de CCL2, IFN- γ e sTREM-1.

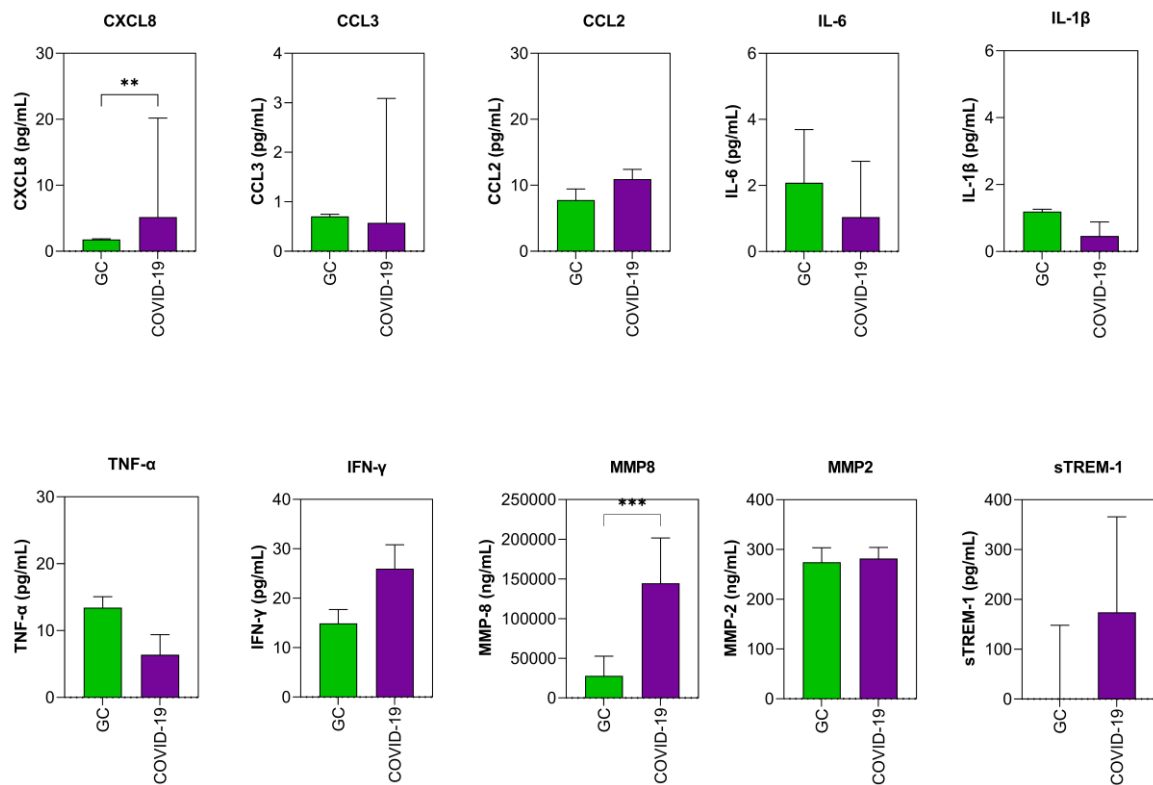


Figura 11: Níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e pacientes com COVID-19. Os gráficos acima representados em mediana + IC (intervalo de confiança) de 95%, ilustram os níveis séricos de mediadores solúveis em pg/mL e ng/mL, na comparação entre grupo controle (GC) e pacientes com COVID-19. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Mann-Whitney e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ■ Refere-se ao grupo controle e ■ grupo de pacientes com COVID-19.

Avaliamos o perfil de resposta imunológica com base nos níveis de mediadores solúveis nos pacientes com COVID-19, de acordo com a gravidade clínica destes indivíduos, entretanto, como mencionado anteriormente, devido à ausência de critérios clínicos e demais dados laboratoriais que possibilitassem uma melhor classificação de gravidade clínica da doença, consideramos os seguintes parâmetros clínicos obtidos direto do prontuário eletrônico desses pacientes (uso de ventilação mecânica, internação em UTI ou enfermaria e desfecho clínico), para estratificá-los em grave e não grave.

Desse modo, de acordo com o status de gravidade clínica, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos para os níveis séricos de CXCL8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-γ e MMP-8.

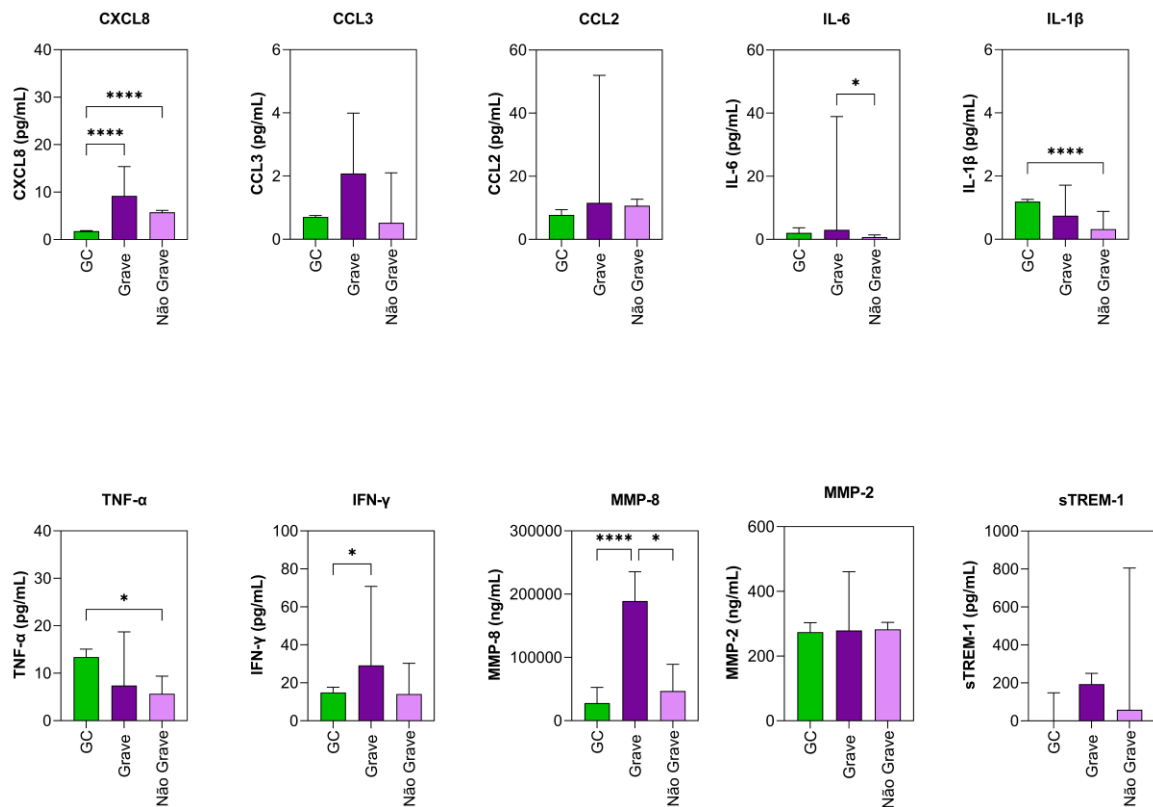


Figura 12: Níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e pacientes com COVID-19 estratificados em grave e não grave. Os gráficos acima representados em mediana + IC (intervalo de confiança) de 95%, ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL e ng/mL, em pacientes com COVID-19, que foram estratificados em comorbidades e sem comorbidades. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ■ Refere-se ao grupo controle (GC), ■ refere-se ao grupo de pacientes com COVID-19 grave e ■ refere-se ao grupo de pacientes com COVID-19 não grave.

Como importante fator de risco para o agravamento da COVID-19, as comorbidades figuram como elemento importante nesse contexto. Dessa forma, estratificamos o grupo de pacientes com COVID-19, em pacientes com comorbidades e sem comorbidades, e também avaliamos os níveis séricos de quimiocinas e citocinas nestes indivíduos. Assim sendo, foram encontradas diferenças significativamente estatísticas ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos, para os níveis de CXCL8, CCL3, IL-6 e MMP-8.

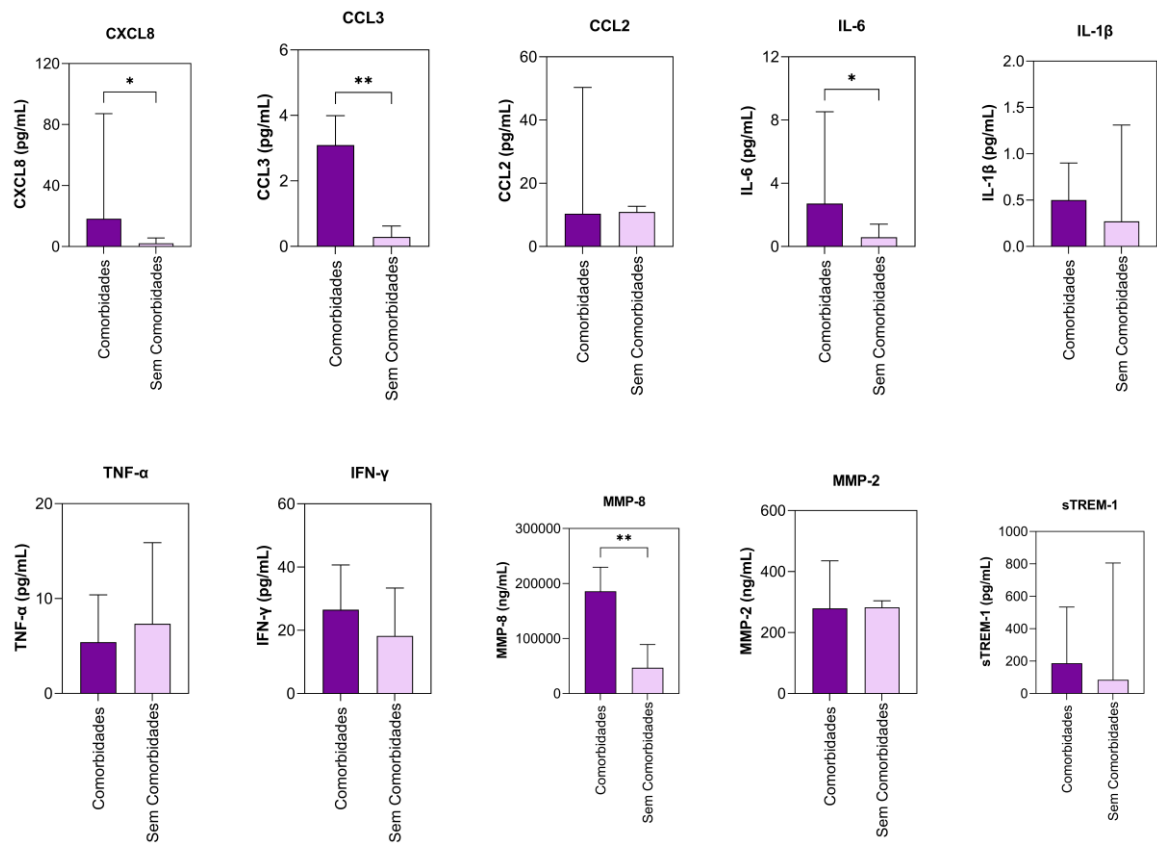


Figura 13: Níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e pacientes com COVID-19 estratificados em comorbidades e sem comorbidades. Os gráficos acima representados em mediana + IC (intervalo de confiança) de 95%, ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL e ng/mL, em pacientes com COVID-19, que foram estratificados em comorbidades e sem comorbidades. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Mann-Whitney e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dessa forma, ■ comorbidades e ■ sem comorbidades.

Avaliamos ainda, o perfil de mediadores solúveis em pacientes com COVID-19, de acordo com o desfecho clínico registrado nos portuários eletrônicos destes pacientes. Apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre os grupos, podemos observar que os níveis de CXCL8, CCL3, IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-γ e MMP-8 estavam aumentados nos indivíduos que vieram a óbito.

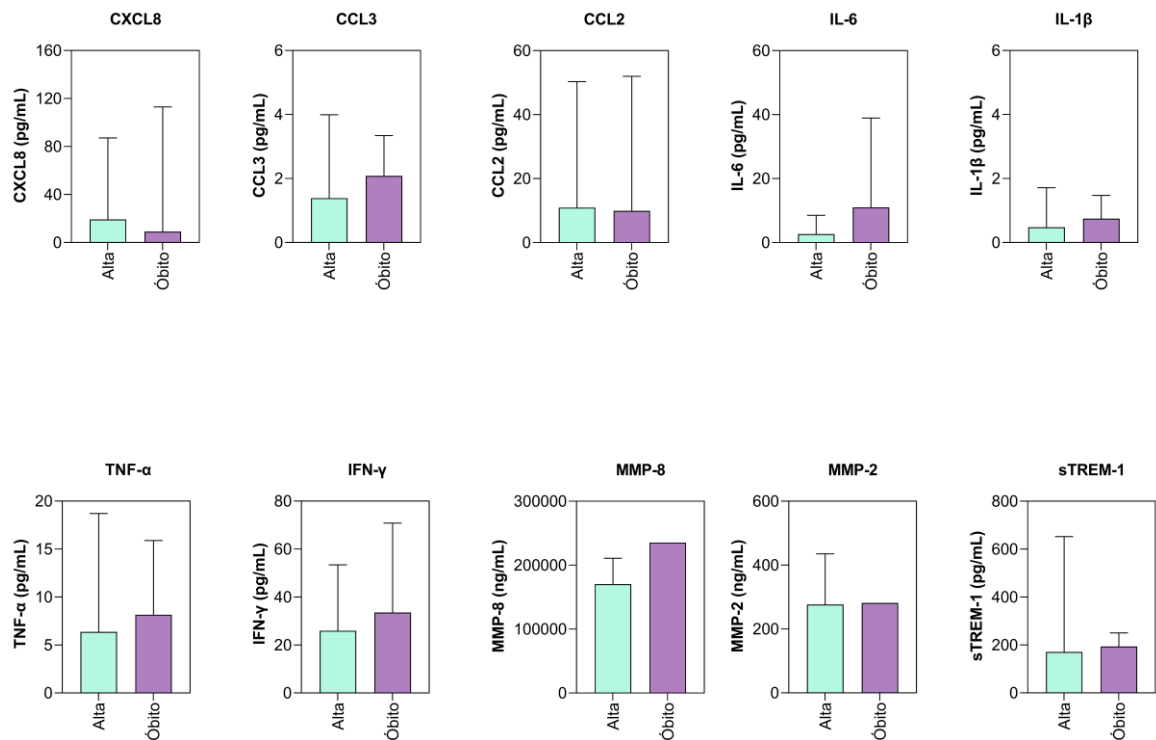


Figura 14: Níveis séricos de quimiocinas e citocinas em controles saudáveis e pacientes com COVID-19 estratificados de acordo com desfecho clínico, em alta e óbito. Os gráficos acima representados em mediana + IQR (intervalo de confiança) de 95%, ilustram os níveis séricos de quimiocinas e citocinas em pg/mL e ng/mL, em pacientes com COVID-19, que foram estratificados em comorbidades e sem comorbidades. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ■ Refere-se ao grupo alta, ■ refere-se ao grupo óbito.

Outrossim, analisamos o perfil de mediadores solúveis em indivíduos convalescentes da COVID-19 dos diferentes tempos de acompanhamento (D30, D60 e D90). Houveram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na comparação entre o grupo controle e os tempos D30, D60 e D90 para CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α . Além disso, foi observada também diferença significativa ($p < 0,05$) para IFN- γ somente na comparação entre grupo controle e D90.

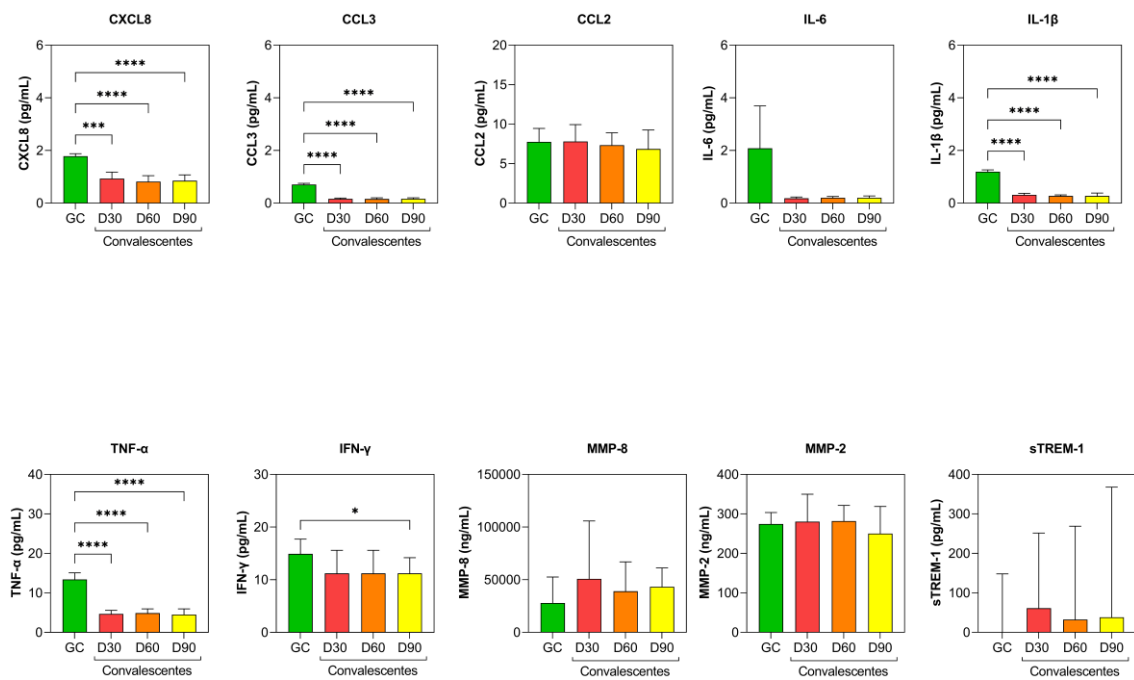


Figura 15: Níveis séricos de mediadores solúveis em controles saudáveis e convalescentes da COVID-19, nos tempos de 30, 60 e 90 dias após a cura clínica da doença. Os gráficos acima representados em mediana + IQR (intervalo de confiança) de 95%, ilustram os níveis séricos de mediadores solúveis em pg/mL e ng/mL, no grupo controle e indivíduos convalescentes da COVID-19. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste Kruskal Wallis e valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dessa forma, ■ refere-se ao grupo controle, ■ refere-se ao grupo D30, ■ refere-se ao D60 e ■ refere-se ao D90.

Uma matriz de correlação de Pearson também foi realizada para avaliar a correlação entre parâmetro hematológicos, mediadores solúveis, metaloproteínas e sTREM-1 em cada grupo estudado. A partir disso, elaboramos redes de interação biológica para avaliar a dinâmica da resposta imunológica ao SARS-CoV-2. Desse modo, podemos observar que a dinâmica de interação entre os parâmetros analisados é diferente nos pacientes com COVID-19, quando comparadas ao grupo controle e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2.

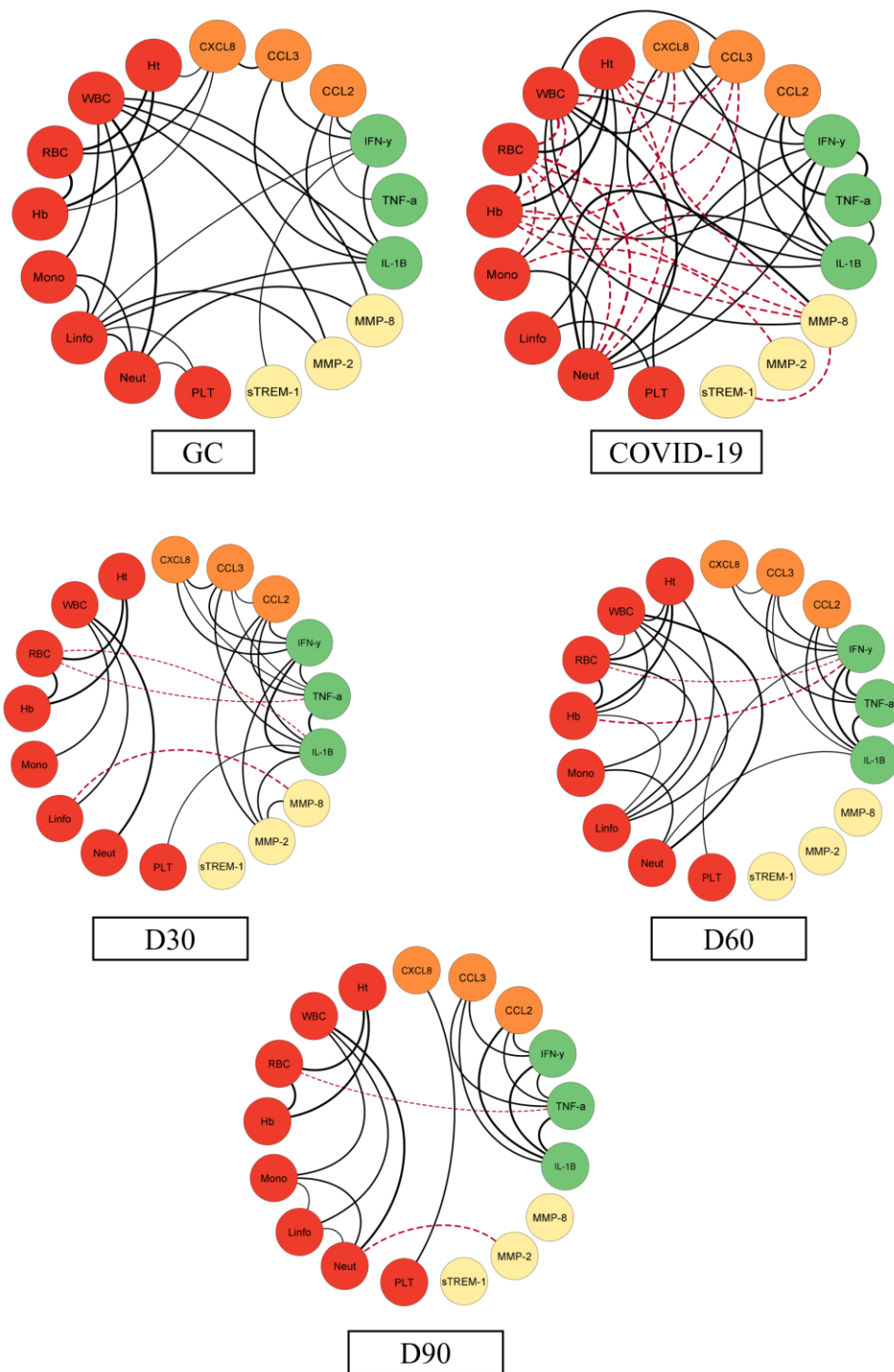


Figura 16: Rede de interação de mediadores solúveis na população na população de estudo.

DISCUSSÃO

A pandemia de COVID-19 abalou sistemas de saúde e econômico ao redor do mundo, e levou a esforços conjuntos de vários países, em pesquisas que trouxessem evidências científicas e uma melhor compreensão da transmissão do vírus, da dinâmica da resposta imunológica a infecção, do processo de cura da doença e possíveis medidas terapêuticas e de prevenção, como

as vacinas. Nesse contexto, conhecer e compreender vários aspectos relacionados a resposta imunológica a infecção pelo coronavírus, possíveis tratamentos baseados em evidências científicas, bem como, o surgimento de variantes virais, e entender como a genética dos indivíduos poderia influenciar no curso clínico da infecção em um curto espaço de tempo, foi desafiador.^{54,55,60}

De acordo com o advento de evidências científicas que foram surgindo ao longo da pandemia, a infecção por SARS-CoV-2 mostrou-se ser inicialmente uma infecção respiratória, mas que também poderia apresentar-se como infecção sistêmica, tendo em vista o comprometimento de vários órgãos e sistemas. Além disto, foi visto que alguns pacientes com COVID-19, poderiam ter sintomas persistentes da infecção por semanas até meses após o início dos sintomas, o que muitos estudos estabeleceram como COVID-19 longa ou síndrome pós-COVID-19.^{54,55,60-62}

Como visto anteriormente, nosso grupo de pacientes com COVID-19, é composto por pessoas de mais idade quando comparado ao grupo controle e grupo de indivíduos convalescentes, e a maioria são indivíduos do sexo masculino, em conformidade com o que foi demonstrado por Zhang e colaboradores. Ainda, em comparação ao grupo controle, os pacientes com COVID-19, apresentaram níveis diminuídos de alguns parâmetros hematológicos como hemoglobina, hematócrito, linfócitos e plaquetas. Podemos observar ainda que, estes pacientes também apresentaram discreta leucocitose com neutrofilia, que é frequentemente relatada em achados laboratoriais de pacientes com COVID-19. Como observado em nosso grupo de pacientes, linfopenia e neutrofilia têm sido frequentemente relatadas em pacientes com COVID-19 em outros estudos, conforme demonstrado por Zhang e colaboradores, Xiaohog Yuan e colaboradores e Xie J. e colaboradores.⁶³⁻⁶⁵

Até o presente momento, pouco se sabe sobre a contribuição de variantes no gene *TREMI* em relação ao risco ou desenvolvimento da forma grave de doenças infecciosas. No entanto, para ambas as variantes, nosso estudo demonstra que a frequência genotípica e alélica se encontra em concordância com as frequências demonstradas em Golovkin e colaboradores e Su L. Liu e colaboradores e de Jesus M. e colaboradores.

Em continuidade, apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significantes na análise das frequências genotípicas e alélicas para ambas as variantes, alguns estudos têm observado que para a variante rs2234237, o alelo T pode ser fator de risco para malária e doença de Behçet em uma coorte coreana. No entanto, outros estudos demonstraram a falta de associação dos genótipos da mesma variante na forma grave de sepse e choque séptico.^{43,66-69}

De modo semelhante, para a variante rs2234246, apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significantes na análise das frequências genóticas e alélicas, o alelo C, demonstrou estar associado a aumento da suscetibilidade à ocorrência de Síndrome Congênita do Zika em bebês.⁷⁰

Como mencionado anteriormente, a variante rs2234237 do gene TREM-1, é uma variante missense onde há a troca da base adenina pela timina na posição 41282728 da sequência nucleotídica do gene, e isso resulta na troca do aminoácido serina pela treonina, na posição 73 da cadeia polipeptídica. Já o SNV rs2234246, é uma variante que se encontra localizado na região promotora do éxon 4 do gene TREM-1, onde há a troca da base citosina pela timina na posição 41276002 da sequência nucleotídica do gene.^{67,71}

Verificamos que, nossos dados para avaliação da influência dos genótipos do SNV rs2234246 sob níveis séricos de sTREM-1 para o grupo controle, estão de acordo com o que foi demonstrado por Arguinano e colaboradores, e Li Xiao e colaboradores, no entanto, essa concordância restringe-se ao grupo controle, visto que neste grupo, o alelo T, especialmente em homozigose, aparentemente favorece aumento nos níveis de sTREM-1.

Ainda, nossos achados revelam que, embora o alelo T do SNV rs2234237 aparentemente favoreça o aumento de sTREM-1 em nosso estudo, também podemos observar que a maioria dos indivíduos que não apresentam níveis de sTREM-1 são homozigotos para o alelo T. Isso se deve ao fato de que, em todos os grupos estudados, e especialmente no grupo controle, alguns indivíduos apresentaram níveis bastante elevados de sTREM-1. Entretanto, esses altos níveis de sTREM-1 correspondem a indivíduos heterozigotos, ou seja, que apresentaram o genótipo A/T da variante rs2234237. Até o momento, outros estudos já foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos desses SNVs nos níveis séricos de sTREM-1, no entanto, não conseguiram demonstrar associação entre os genótipos da variante rs2234237 e a concentração dinâmica de sTREM-1.⁶⁷

Sabe-se que a ativação do receptor TREM-1 promove a liberação de muitos mediadores pro-inflamatórios em resposta a infecção por diferentes de patógenos tanto em modelos humanos como em camundongos.^{7,72,73} Em contrapartida, trabalhos anteriores mostraram que em indivíduos com malária o alelo T da variante rs2234237, principalmente em homozigotos T/T, apresentaram níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, corroborando nossos achados para TNF- α no tempo D30, D60 e D90 nos indivíduos convalescentes.⁷⁴

Diferente dos nossos achados para CXCL8 e IL-1 β , trabalhos anteriores não demonstraram associação entre os genótipos da variante rs2234237 sob os níveis de CXCL8 e

IL-1 β .⁶⁹ Até o momento, não há dados na literatura avaliando a influência dos genótipos dessa variante sob os níveis de CCL3.^{57-59,75}

Nesse sentido, até o momento, não há dados na literatura avaliando os efeitos das variantes rs2234237 A/T e rs2234246 C/T sob os níveis de mediadores solúveis na COVID-19. No entanto, em outras patologias, os efeitos dos genótipos dessas variantes sobre os níveis de mediadores imunológicos em condições como malária, corroboram nossos achados.^{43,59}

Até o momento, não há dados na literatura avaliando os efeitos da variante rs2234246 C/T sob os níveis séricos de CXCL8, CCL3 e IL-1 β na COVID-19, ou até mesmo em outras patologias. No entanto, trabalhos anteriores mostraram que controles com genótipo C/T apresentaram níveis mais elevados de TNF- α e IFN- γ , quando comparados ao genótipo C/T de indivíduos com malária, corroborando nossos achados para esses mediadores.⁷⁴

Os mediadores imunológicos têm sido extensivamente estudados no contexto da COVID-19, seja na busca pela compreensão da dinâmica dessas moléculas na resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2, efeitos nas células alvo, busca e estabelecimento de biomarcador imunológico, previsão de gravidade e mortalidade e melhor entendimento do desenvolvimento da inflamação sistêmica e tempestade de citocinas na doença.^{76,77}

Nossos achados demonstram que, na comparação entre grupo controle vs COVID-19, os mediadores CXCL8, CCL-3, CCL-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ estão aumentados em nossa coorte de pacientes. Da mesma forma, na comparação entre pacientes com COVID-19 grave vs não grave, os mesmos mediadores citados acima estão aumentados em pacientes graves. Igualmente, na análise entre pacientes com comorbidades vs sem comorbidades e análise de desfecho clínico comparando alta e óbito, os mediadores CXCL8, CCL-3, CCL-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ estavam aumentados em pacientes com comorbidades e indivíduos que vieram a óbito pela doença. Portanto, nossos achados são corroborados por vários trabalhos, que têm demonstrado níveis aumentados dos mediadores imunológicos CXCL8, CCL-3, CCL-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , em pacientes com COVID-19, análise de gravidade da doença e desfecho clínico em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2.⁷⁶⁻⁸⁰

Em nossa coorte de pacientes com COVID-19, muitos apresentaram comorbidades como diabetes e hipertensão, o que pode potencializar a liberação de MMPs nesses indivíduos. Outrossim, o estado inflamatório desses pacientes, em virtude das comorbidades e aliado a hiperativação do sistema imunológico em decorrência da COVID-19, aparenta ser uma explicação plausível para os altos níveis de mediadores inflamatórios encontrados em nossa coorte.^{81,82}

Embora não tenhamos observado significância estatística nos níveis de mediadores solúveis na análise de desfecho clínico comparando alta e óbito, podemos observar que muitos mediadores inflamatórios estavam aumentados em indivíduos que vieram a óbito pela doença. Ressalta-se que muitos destes pacientes que vieram a óbito, apresentavam comorbidades, fizeram uso de ventilação mecânica e foram admitidos em UTI, o que aponta para um quadro de inflamação exacerbada nestes indivíduos.

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória liberada por uma infinidade de tipos celulares como, macrófagos, linfócitos, células dendríticas, linfócitos B e T, dentre outros, em resposta a infecções e dano tecidual. Uma vez que atinge seu receptor, desencadeia vias de sinalização associadas a ativação da via JAK/STAT3, promovendo a produção de diversos mediadores imunológicos, envolvidos na sinalização celular e expressão gênica, influenciando direta e indiretamente na liberação de outros mediadores imunológicos. Nesse sentido, a atuação da IL-6 é de extrema importante no controle das infecções virais, tendo em vista seu potencial de atuação nos diversos âmbitos da resposta imunológica.^{83,84}

A CXCL8, é produzida e secretada por fagócitos e células mesenquimais, e atua como importante molécula quimioatrativa e ativadora de neutrófilos na inflamação, e também é promotora do crescimento e diferenciação de monocitos/macrófagos.⁸⁵⁻⁸⁸ Além disso, CXCL8 também pode atuar na reestruturação do citoesqueleto celular, provocar mudanças nos níveis de cálcio no ambiente intracelular e contribuir para a ativação de integrinas e exocitose de proteínas granulares. Em continuidade, CXCL8 também pode aumentar o metabolismo oxidativo, além de perpetuar a sobrevivência de células endoteliais, proliferação celular e angiogênese.⁸⁵⁻⁸⁸ Adicionalmente, CXCL8 atua induzindo a liberação de metaloproteinases de matriz, que por sua vez, possuem a capacidade de degradar produtos da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, citocinas e quimiocinas, o que pode contribuir com o comprometimento imunológico desses pacientes.^{89,90} Outros trabalhos, também reforçam nossos achados para altos níveis de MMP-8 em pacientes com COVID-19.^{91,92}

As MMPs atuam de forma muito semelhante a outros mediadores solúveis como quimiocinas e citocinas. Entretanto, suas funções compreendem o remodelamento de matriz tecidual através das clivagem de moléculas que compõem essa matriz, clivagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que participam das respostas imunológicas, além de receptores acoplados a membrana celular. Ainda, as MMPs em estado fisiológico, são pouco expressas nos mais diversos tecidos humanos, em contrapartida, a inflamação, reparo e renovação tecidual, podem favorecer a liberação de MMPs em diversos tecidos.^{46,47,93,94}

Em nosso estudo, nossos dados mostram que pacientes com COVID-19 apresentam valores aumentados de sTREM-1, apesar de não observarmos diferença estatisticamente significativa na comparação com o grupo controle. No entanto, como podemos observar, a expressão de sTREM-1 segue o mesmo padrão da expressão de MMP-8 nesses indivíduos. Aliado a isso, trabalhos anteriores sugeriram que MMPs podem contribuir como mecanismo de liberação de sTREM-1, no entanto, em nosso modelo de estudo não foi possível determinar isso.⁹⁵ A função de sTREM-1 permanece até o momento desconhecida, no entanto, na COVID-19 e em outras patologias como sepse e malária, sTREM-1 tem sido proposto como um biomarcador de gravidade e preditor de mortalidade.^{39,40,43,96,97}

Um estudo realizado no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto e Hospital São Paulo de Ribeirão Preto, no período de julho a dezembro de 2020, investigou o papel do sTREM-1 como biomarcador da gravidade e mortalidade da COVID-19 em 237 indivíduos. O referido estudo, demonstrou que os níveis séricos de sTREM-1 foram significativamente maiores entre os pacientes com doença grave em comparação com todos os outros grupos. Além disso, sTREM-1 solúvel está associado a moléculas inflamatórias e comorbidades, e ao analisar mudanças longitudinais nesses pacientes, os referidos autores observaram que sTREM-1 foi útil na predição de mortalidade em pacientes hospitalizados com COVID-19.³⁹

Um estudo de Nooijer⁴⁰, demonstrou que níveis plasmáticos elevados de sTREM-1 em pacientes graves de COVID-19 estão correlacionados com tempo de internação mais longo, desenvolvimento de eventos tromboembólicos e gravidade da doença. Os referidos autores, também relataram que sTREM-1 está associado a um aumento de mediadores inflamatórios como proteína C reativa, ferritina, IL-6, D-dímero, contagem de leucócitos e contagem de linfócitos. Esses achados, demonstram que sTREM-1 pode estar fortemente associado a resposta inflamatória sistêmica nesses pacientes.

Tornai e colaboradores⁹⁷, demonstraram que em pacientes cirróticos e com infecção bacteriana, níveis aumentados de sTREM-1 estão associados a gravidade da doença, especialmente em pacientes sépticos, pois estes apresentaram níveis séricos ainda mais elevados. Além disso, sTREM-1 também está associado a mediadores inflamatórios nesses pacientes, e é fortemente associado a mortalidade em 90 dias.

Wright e colaboradores⁹⁶, buscaram identificar potenciais biomarcadores com evidências preditivas convincentes de mortalidade em pacientes com suspeita de sepse. Os referidos autores, relataram que sTREM-1 e os demais biomarcadores quando analisados em

conjunto melhoram a predição de mortalidade, e dessa forma, foram fortemente associados a óbito em 28 dias.

Ainda, em pacientes com fibrose cística, Forrester⁹⁸ demonstrou que níveis séricos elevados de sTREM-1, estão correlacionados positivamente a níveis aumentados de MMP8 e MMP9 quando comparados a indivíduos controles.

Jesus e colaboradores⁹⁹, avaliaram mediadores inflamatórios na malária durante a coinfeção com enteroparasitas, e constataram níveis mais elevados de sTREM-1 e IL-6 em pacientes com malária quando comparados a indivíduos controles. Entretanto, ao comparar pacientes com malária com pacientes coinfectados e com pacientes infectados por enteroparasitas, os achados demonstraram uma leve diminuição nos níveis de sTREM-1 no grupo coinfectado. Aliado a isso, ao analisar a proporção de citocinas pró e anti-inflamatorias, a IL-10 apresentou-se mais elevada em pacientes coinfectados.

Em nossa coorte de indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2, observamos que os mediadores CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ estavam diminuídos nos três tempos de acompanhamento na comparação com o grupo controle. Poucos estudos têm explorado a assinatura imunológica de mediadores solúveis em convalescentes da infecção por SARS-CoV-2. Nossos achados contrastam com estudos feitos anteriormente, tendo em vista que, nestes estudos, por sua vez, indivíduos infectados por SARS-CoV-2, permanecem com níveis aumentados de alguns mediadores solúveis por várias semanas até muitos meses após a doença.^{61,62,100}

Observamos ainda que, embora não haja diferença significativa na comparação entre os grupos para os níveis de MMP-8, é possível observar que em indivíduos convalescentes, mesmo após 30 dias de cura clínica da COVID-19, os níveis de MMP-8 são muito mais elevados quando comparados ao grupo controle, e que há uma leve tendencia de queda nos níveis, conforme os tempos de acompanhamento destes indivíduos. Ainda, ao observarmos sTREM-1, vemos que este mediador solúvel, comporta-se de maneira semelhante a CCL2 e MMP-8, mesmo que não haja diferença significativa nas comparações entre os grupos.

A análise das redes de interação biológica entre parâmetros hematológicos e mediadores solúveis, nos mostram que pacientes com COVID-19 apresentam um padrão de interação bem diferente em comparação as redes de controles saudáveis e indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2 nos tempos de 30, 60 e 90 dias após a cura clínica da doença. Sabe-se que a COVID-19 é uma infecção respiratória que apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde a ausência de sintomas podendo progredir para sintomas graves com falência múltipla de órgãos e óbito.^{1,6,9,29,101}

Uma característica marcante da doença, que foi relatada em muitos pacientes que evoluíram para forma grave, foi a síndrome da tempestade de citocinas, de modo que, em virtude da hiperativação e desregulação do sistema imunológico, ocorre uma rápida elevação dos níveis de mediadores inflamatórios em pacientes acometidos da infecção por SARS-CoV-2, podendo levar ao comprometimento do funcionamento de vários órgãos durante o curso da doença.^{1,6,9,29,101} Como demonstrado em estudos anteriores, em decorrência da infecção por SARS-CoV-2 os níveis de mediadores solúveis podem permanecer elevados por algumas semanas até meses após a infecção.^{61,62,100,102}

Como principais limitações do estudo temos, a ausência de critérios clínicos que nos possibilitassem estabelecer melhor classificação e estratificação dos pacientes com COVID-19. Em nossa coorte de pacientes com COVID-19, muitos dos nossos pacientes apresentaram comorbidades, e nesse sentido, poucos estudos avaliam os níveis sTREM-1 em pacientes com comorbidades como, hipertensão e diabetes. Nosso estudo foi limitado devido ao tamanho da coorte. Estudos com um número maior de participantes seria necessário para compreender os efeitos de sTREM-1 em estado fisiológico e em condições de doença.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a investigar a relação entre variantes no gene do receptor TREM-1 e COVID-19 na Amazônia Brasileira. Em conjunto, nossos dados mostram que as variantes rs2234237 e rs2234246 não estão associadas significativamente a gravidade e/ou mortalidade na COVID-19. Novos estudos incluindo outras variantes do gene *TREM1* são necessários para um melhor entendimento sobre a atuação deste receptor no sistema imunológico e na modulação da liberação de mediadores imunológicos em resposta a infecção por SARS-CoV-2.

7 CONCLUSÃO

O alelo T da variante rs2234237 foi o mais frequente na população de estudo, principalmente em homozigose. O genótipo C/T da variante rs2234246 foi o mais frequente no grupo controle e no grupo de pacientes com COVID-19, no entanto, o alelo C foi mais frequente no grupo com COVID-19 e o alelo T foi o mais frequente no grupo controle. Já o genótipo C/C da variante rs2234246, foi o mais frequente em pacientes com COVID-19 grave e no grupo alta, e em ambos os grupos o alelo C foi o mais prevalente. Em contrapartida, o genótipo C/T da mesma variante foi o mais frequente no grupo não grave de pacientes com COVID-19 e no grupo óbito. No grupo óbito, ambos os alelos da variante rs2234246 foram igualmente distribuídos.

Ainda, o alelo T da variante rs2234237 contribui para aumento na concentração de mediadores imunológicos na população de estudo. Em continuidade, para a variante rs2234246 o alelo T favorece o aumento na concentração de quimiocinas e citocinas no grupo controle, ao passo que, o alelo C contribui para esse aumento no grupo de pacientes com COVID-19 e em indivíduos convalescentes.

Também concluímos que o alelo T da variante rs2234237 contribui para o aumento nos níveis séricos de sTREM-1 na população de estudo, ao passo que, para a variante rs2234246, alelo T favorece o aumento da concentração de sTREM-1 no grupo controle, e o alelo C contribui para aumento nos níveis séricos de sTREM-1 em pacientes com COVID-19 e em indivíduos convalescentes da infecção por SARS-CoV-2.

Além disso, pacientes com COVID-19 apresentam níveis elevados de CXCL8, MMP-8 e sTREM-1, sobretudo pacientes com a forma grave da infecção, com comorbidades, e que vieram a óbito, também apresentaram níveis elevados desses mediadores solúveis, além níveis séricos aumentados de CCL2, CCL3, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ .

Em nossa coorte de convalescentes, os níveis de mediadores imunológicos foram significativamente diminuídos em todos os tempos de acompanhamento, sobretudo os níveis de CXCL8, CCL3, IL-1 β , TNF- α .

Este é o primeiro estudo a investigar a relação entre TREM-1 e COVID-19 na Amazônia Brasileira. Os resultados deste estudo poderão contribuir para a identificação e determinação da participação efetiva do receptor TREM-1 na modulação da resposta imune, essencial para o entendimento da dinâmica da resposta imunológica a infecção por SARS-CoV-2.

8 REFERÊNCIAS

1. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* [Internet]. 2020;41(12):1100–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
2. Ministério da Saúde do Brasil. No Title. 2022.
3. WHO. No Title. 2022.
4. Lionel B. Ivashkiv^{1, 2 3} and Laura T. Donlin¹. Regulation of type I interferon responses Lionel. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27(1):53–4.
6. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 [Internet]. 2020 Jul 25 [cited 2021 Oct 25];5(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00243-2>
7. 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*. 2000;164(10):4991–5.
8. Tamaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;177:81–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.043>
9. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(18):1708–20.
10. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020;323(11):1061–9.
11. Muralidar S, Visaga S, Sekaran S. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information. *Biochimie*. 2020;179(January):85–100.
12. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
13. Teich VD, Klajner S, Almeida FAS de, Dantas ACB, Laselva CR, Torritesi MG, et al. Epidemiologic and clinical features of patients with COVID-19 in Brazil. *Einstein (Sao Paulo)*. 2020;18:eAO6022.
14. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–3.

15. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(37):12910–34.
16. Mishra KP, Singh AK, Singh SB. Hyperinflammation and Immune Response Generation in COVID-19. *Neuroimmunomodulation*. 2021;27(2):80–6.
17. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):141–54.
18. Folha informativa sobre COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [cited 2022 Aug 2]. Available from: <https://www.paho.org/pt/covid19>
19. Ministério da Saúde - Governo Federal do Brasil — Português (Brasil) [Internet]. [cited 2022 Aug 2]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br>
20. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 variants of concern. *Yonsei Med J*. 2021;62(11):961–8.
21. OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [cited 2022 Aug 2]. Available from: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e>
22. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol*. 2022;12(January):1–21.
23. Naveca FG, Nascimento V, de Souza VC, Corado A de L, Nascimento F, Silva G, et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat Med*. 2021;27(7):1230–8.
24. Portal FVS-RCP/AM [Internet]. [cited 2022 Aug 2]. Available from: <https://www.fvs.am.gov.br/>
25. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):155–70.
26. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26(4):450–2.
27. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424–32.
28. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;75(7):1730–41.
29. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the Immune System. 2020;9973:379–88.
30. Ekstedt S, Piersiala K, Petro M, Karlsson A, Kågedal Å, Kumlien Georén S, et al. A prolonged innate systemic immune response in COVID-19. *Sci Rep*. 2022;12(1):1–9.

31. Siracusano G, Pastori C, Lopalco L. Humoral Immune Responses in COVID-19 Patients: A Window on the State of the Art. *Front Immunol.* 2020;11(May):1–9.
32. Cagdas D. Convalescent plasma and hyperimmune globulin therapy in COVID-19. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1894927> [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 19];17(4):309–16. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1744666X.2021.1894927>
33. Bégin P, Callum J, Jamula E, Cook R, Heddle NM, Tinmouth A, et al. Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: an open-label, randomized controlled trial. *Nat Med* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Jul 19];27(11):2012. Available from: </pmc/articles/PMC8604729/>
34. Tobian AAR, Cohn CS, Shaz BH. COVID-19 convalescent plasma. *Blood* [Internet]. 2022 Jul 7 [cited 2023 Jul 19];140(3):196. Available from: </pmc/articles/PMC8548835/>
35. Jorda A, Kussmann M, Kolenchery N, Siller-Matula JM, Zeitlinger M, Jilma B, et al. Convalescent Plasma Treatment in Patients with Covid-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Feb 7 [cited 2023 Jul 19];13:817829. Available from: </pmc/articles/PMC8859444/>
36. Kanj S, Al-Omari B. Convalescent Plasma Transfusion for the Treatment of COVID-19 in Adults: A Global Perspective. *Viruses* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 19];13(5). Available from: </pmc/articles/PMC8148438/>
37. Palazzo SJ, Simpson T, Schnapp LM. *Dimens Crit Care Nurs.* 2012 Jan-Feb;31(1) 1-6. 2016;31(1):1–6.
38. Roe K, Gibot S, Verma S. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): A new player in antiviral immunity? *Front Microbiol.* 2014;5(NOV):1–11.
39. da Silva-Neto P V., de Carvalho JCS, Pimentel VE, Pérez MM, Toro DM, Fraga-Silva TFC, et al. Strem-1 predicts disease severity and mortality in covid-19 patients: Involvement of peripheral blood leukocytes and mmp-8 activity. *Viruses.* 2021;13(12):1–17.
40. de Nooijer AH, Grondman I, Lambden S, Kooistra EJ, Janssen NAF, Kox M, et al. Increased sTREM-1 plasma concentrations are associated with poor clinical outcomes in patients with COVID-19. *Biosci Rep.* 2021;41(7):1–12.
41. Tamaro A, Derive M, Gibot S, Leemans JC, Florquin S, Dessing MC. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol Ther.* 2017;177:81–95.
42. Genua M, Rutella S, Correale C, Danese S. The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis. *J Transl Med.* 2014;12(1):1–12.
43. Adukpo S, Gyan BA, Ofori MF, Dodoo D, Velavan TP, Meyer CG. Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) and cytokine gene variants in complicated and uncomplicated malaria. *Tropical Medicine and International Health.* 2016;21(12):1592–601.

44. Pavan Kumar N, Venkataraman A, Varadarjan P, Nancy A, Rajamanickam A, Selladurai E, et al. Role of matrix metalloproteinases in multi-system inflammatory syndrome and acute COVID-19 in children. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9(December):1–11.
45. da Silva-Neto P V., Do Valle VB, Fuzo CA, Fernandes TM, Toro DM, Fraga-Silva TFC, et al. Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress. *Biomolecules*. 2022;12(5).
46. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. Vol. 92, *Circulation Research*. 2003. p. 827–39.
47. Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Adv Pharmacol [Internet]*. 2018 [cited 2023 Apr 20];81:241. Available from: </pmc/articles/PMC5765875/>
48. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells [Internet]*. 2020 Apr 26 [cited 2023 Apr 20];9(5). Available from: </pmc/articles/PMC7290392/>
49. Abdel-Latif MS. Plasma Levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and Tumor Necrosis Factor- α in Chronic Hepatitis C Virus Patients. *Open Microbiol J [Internet]*. 2015 Sep 16 [cited 2023 Apr 24];9(1):136. Available from: </pmc/articles/PMC4598372/>
50. D`Avila-Mesquita C, Couto AES, Campos LCB, Vasconcelos TF, Michelon-Barbosa J, Corsi CAC, et al. MMP-2 and MMP-9 levels in plasma are altered and associated with mortality in COVID-19 patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy [Internet]*. 2021 Oct 1 [cited 2023 Apr 24];142:112067. Available from: </pmc/articles/PMC8376652/>
51. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2022 Feb 1 [cited 2023 Jul 5];23(3):1806. Available from: </pmc/articles/PMC8837018/>
52. Aldasoro Arguinano AA, Dadé S, Stathopoulou M, Derive M, Coumba Ndiaye N, Xie T, et al. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLoS One*. 2017;12(8):1–16.
53. Su L, Liu C, Li C, Jiang Z, Xiao K, Zhang X, et al. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. *Inflammation [Internet]*. 2012 Dec [cited 2023 Apr 20];35(6):1833–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22798017/>
54. Umakanthan S, Sahu P, Ranade A V., Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J [Internet]*. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 18];96(1142):753. Available from: </pmc/articles/PMC10016932/>

55. Zhang H ping, Sun Y li, Wang Y fen, Yazici D, Azkur D, Ogulur I, et al. Recent developments in the immunopathology of COVID-19. *Allergy* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Jul 18];78(2):369. Available from: [/pmc/articles/PMC10108124/](#)
56. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science (1979)* [Internet]. 2022 Mar 11 [cited 2023 Jul 18];375(6585):1122–7. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abm8108>
57. Golovkin AS, Ponasenko A V., Yuzhalin AE, Salakhov RR, Khutornaya M V., Kutikhin AG, et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. *Cytokine* [Internet]. 2015;71(1):16–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.08.001>
58. Golovkin AS, Ponasenko A V., Khutornaya M V., Kutikhin AG, Salakhov RR, Yuzhalin AE, et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene* [Internet]. 2014;550(1):101–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.022>
59. de Jesus MCS, Cerilo-Filho M, Ramirez ADR, Menezes RAO, Gomes MSM, Cassiano GC, et al. Influence of trem-1 gene polymorphisms on cytokine levels during malaria by *Plasmodium vivax* in a frontier area of the Brazilian Amazon. *Cytokine* [Internet]. 2023 Sep;169:156264. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466623001424>
60. Da Silva SJR, Do Nascimento JCF, Germano Mendes RP, Guarines KM, Targino Alves Da Silva C, Da Silva PG, et al. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2022 Sep 9 [cited 2023 Jul 10];8(9):1758–814. Available from: [/pmc/articles/PMC9380879/](#)
61. Espín E, Yang C, Shannon CP, Assadian S, He D, Tebbutt SJ. Cellular and molecular biomarkers of long COVID: a scoping review. *EBioMedicine* [Internet]. 2023 Apr 8 [cited 2023 Jul 5];91:104552. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37037165>
62. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 2023 Jul 5];584(7821):463. Available from: [/pmc/articles/PMC7477538/](#)
63. Xie J, Ding C, Li J, Wang Y, Guo H, Lu Z, et al. Characteristics of patients with coronavirus disease (COVID-19) confirmed using an IgM-IgG antibody test. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jun 20];92(10):2004. Available from: [/pmc/articles/PMC7264659/](#)
64. Yuan X, Huang W, Ye B, Chen C, Huang R, Wu F, et al. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int J Hematol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jun 19];112(4):553. Available from: [/pmc/articles/PMC7354745/](#)
65. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020 Jul 1;75(7):1730–41.

66. Chen QX, Zhou HD, Wu SJ, Wang HH, Lv C, Cheng BL, et al. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum Immunol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2023 Jun 19];69(3):220–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18396215/>
67. Su L, Liu C, Li C, Jiang Z, Xiao K, Zhang X, et al. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. *Inflammation* [Internet]. 2012 Dec [cited 2023 Jun 19];35(6):1833–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22798017/>
68. Jung ES, Kim SW, Moon CM, Shin DJ, Son NH, Kim ES, et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory bowel diseases in the Korean population. *Life Sci* [Internet]. 2011 Aug 29 [cited 2023 Jun 19];89(9–10):289–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763322/>
69. Santo Júnior JDE, de Mesquita TGR, da Silva LDO, de Araújo FJ, de Souza JL, de Lacerda TC, et al. Trem1 rs2234237 (Thr25ser) polymorphism in patients with cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis: A case-control study in the state of Amazonas, Brazil. *Pathogens* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 19];10(4). Available from: </pmc/articles/PMC8074324/>
70. Santos CNO, Magalhães LS, Fonseca AB de L, Bispo AJB, Porto RLS, Alves JC, et al. Association between genetic variants in TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8 and TLR7 genes with the occurrence of congenital Zika syndrome and severe microcephaly. *Scientific Reports* 2023 13:1 [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 Jun 19];13(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-30342-3>
71. Aldasoro Arguinano AA, Dadé S, Stathopoulou M, Derive M, Coumba Ndiaye N, Xie T, et al. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. *PLoS One* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Apr 20];12(8):e0182226. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0182226>
72. Hyun J, McMahan RS, Lang AL, Edwards JS, Badilla AD, Greene ME, et al. HIV and HCV augments inflammatory responses through increased TREM-1 expression and signaling in Kupffer and Myeloid cells. *PLoS Pathog* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Jun 15];15(7). Available from: </pmc/articles/PMC6625740/>
73. Wang F, Liu S, Wu S, Zhu Q, Ou G, Liu C, et al. Blocking TREM-1 signaling prolongs survival of mice with *Pseudomonas aeruginosa* induced sepsis. *Cell Immunol*. 2012 Jan 1;272(2):251–8.
74. de Jesus MCS, Cerilo-Filho M, Ramirez ADR, Menezes RAO, Gomes MSM, Cassiano GC, et al. Influence of trem-1 gene polymorphisms on cytokine levels during malaria by *Plasmodium vivax* in a frontier area of the Brazilian Amazon. *Cytokine* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2023 Jun 18];169:156264. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466623001424>

75. Chen QX, Zhou HD, Wu SJ, Wang HH, Lv C, Cheng BL, et al. Lack of association between TREM-1 gene polymorphisms and severe sepsis in a Chinese Han population. *Hum Immunol*. 2008;69(3):220–6.
76. Medeiros T, Guimarães GMC, Carvalho FR, Alves LS, Faustino R, Campi-Azevedo AC, et al. Acute kidney injury associated to COVID-19 leads to a strong unbalance of circulant immune mediators. *Cytokine* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Jun 21];157. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35907365/>
77. Kesmez Can F, Özkurt Z, Öztürk N, Sezen S. Effect of IL-6, IL-8/CXCL8, IP-10/CXCL10 levels on the severity in COVID 19 infection. *Int J Clin Pract* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Jun 21];75(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34626520/>
78. McElvaney OJ, McEvoy NL, McElvaney OF, Carroll TP, Murphy MP, Dunlea DM, et al. Characterization of the Inflammatory Response to Severe COVID-19 Illness. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2023 Jun 21];202(6):812–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32584597/>
79. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jun 21];26(10):1636–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32839624/>
80. Hamza M, Alhujaily M, Alosaimi B, El Bakkouri K, AlDughaim MS, Alonazi M, et al. Association between inflammatory cytokines/chemokines, clinical laboratory parameters, disease severity and in-hospital mortality in critical and mild COVID-19 patients without comorbidities or immune-mediated diseases. *J Immunoassay Immunochem* [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 5];44(1):13–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35915975/>
81. Guo W, Li M, Dong Y, Zhou H, Zhang Z, Tian C, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Jul 5];36(7). Available from: </pmc/articles/PMC7228407/>
82. Rajpal A, Rahimi L, Ismail-Beigi F. Factors leading to high morbidity and mortality of COVID-19 in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 5];12(12):895. Available from: </pmc/articles/PMC7405270/>
83. Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL, Borca M V. The role of interleukin 6 during viral infections. Vol. 10, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
84. Santa Cruz A, Mendes-Frias A, Oliveira AI, Dias L, Matos AR, Carvalho A, et al. Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol*. 2021 Feb 18;12.
85. Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Jun 21];23(23):14574. Available from: </pmc/articles/PMC9738067/>

86. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* [Internet]. 1992 Jul 27 [cited 2023 Jun 21];307(1):97–101. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/0014-5793%2892%2980909-Z>
87. Palomino DC arolina T, Marti LC avalheiro. Chemokines and immunity. *Einstein* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2023 Jun 21];13(3):469. Available from: </pmc/articles/PMC4943798/>
88. Baggiolini M, Walz A, Kunkel\$ SL. Perspectives Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a Novel Cytokine That Activates Neutrophils.
89. Thirumangalakudi L, Yin L, Rao HV, Grammas P. IL-8 induces expression of matrix metalloproteinases, cell cycle and pro-apoptotic proteins, and cell death in cultured neurons. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2007 [cited 2023 Jun 21];11(3):305–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17851181/>
90. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2003 Mar 15 [cited 2023 Jun 21];170(6):3369–76. Available from: <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3369>
91. Pavan Kumar N, Venkataraman A, Varadarjan P, Nancy A, Rajamanickam A, Selladurai E, et al. Role of matrix metalloproteinases in multi-system inflammatory syndrome and acute COVID-19 in children. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Dec 5;9.
92. da Silva-Neto P V., Do Valle VB, Fuzo CA, Fernandes TM, Toro DM, Fraga-Silva TFC, et al. Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress. *Biomolecules*. 2022 May 1;12(5).
93. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.
94. Lee HS, Kim WJ. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 10546 [Internet]. 2022 Sep 11 [cited 2023 Mar 22];23(18):10546. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10546/htm>
95. Weiss G, Lai C, Fife ME, Grabiec AM, Tildy B, Snelgrove RJ, et al. Reversal of TREM-1 ectodomain shedding and improved bacterial clearance by intranasal metalloproteinase inhibitors. *Mucosal Immunol*. 2017 Jul 1;10(4):1021–30.
96. Wright SW, Lovelace-Macon L, Hantrakun V, Rudd KE, Teparrukkul P, Kosamo S, et al. sTREM-1 predicts mortality in hospitalized patients with infection in a tropical, middle-income country. *BMC Med*. 2020;18(1):1–9.
97. Tornai D, Vitalis Z, Jonas A, Janka T, Foldi I, Tornai T, et al. Increased sTREM-1 levels identify cirrhotic patients with bacterial infection and predict their 90-day mortality. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* [Internet]. 2021;45(5):101579. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.11.009>

98. Forrester DL, Barr HL, Fogarty A, Knox A. sTREM-1 is elevated in cystic fibrosis and correlates with proteases. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(4):467–71.
99. de Jesus MCS, Barbosa JHR, Menezes RA de O, Gomes M do SM, Bomfim LGS, Pimenta TS, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and other inflammatory mediators in malaria by *Plasmodium vivax* during enteroparasites coinfection. *PLoS One*. 2022;17(6):e0270007.
100. Phetsouphanh C, Darley DR, Wilson DB, Howe A, Munier CML, Patel SK, et al. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology* 2022 23:2 [Internet]. 2022 Jan 13 [cited 2023 Jul 5];23(2):210–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01113-x>
101. Tang Y, Liu J, Zhang D, Xu Z, Ji J, Wen C. Cytokine Storm in COVID-19: The Current Evidence and Treatment Strategies. *Front Immunol*. 2020;11(July):1–13.
102. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* 2020 584:7821 [Internet]. 2020 Jul 27 [cited 2023 Jul 5];584(7821):463–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2588-y>

9 APÊNDICES

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –
DOADOR DE PLASMA CONVALESCENTE – Grupo 1
CAAE: 30975020.9.0000.0009**

Centro de Pesquisa: Universidade Federal do Amazonas (UFAM)/ Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

Projeto: Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).

Pesquisador Principal: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Telefone de contato: (92) 99114-9478

Convidamos o Sr. a participar da pesquisa sobre o estudo de biomarcadores imunológicos (proteínas presentes no sangue) em pacientes que se recuperaram da infecção pelo Coronavírus. O objetivo desta pesquisa é descrever potenciais biomarcadores imunológicos e inflamatórios em Doadores de Plasma obtidos de pacientes que se recuperaram da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19) e associar com a cura e produção de anticorpos nestes indivíduos.

A sua participação é voluntária e se não concordarem participar ou alterar a sua decisão e retirar o consentimento a qualquer momento do estudo, o seu tratamento não será prejudicado. Será possível fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Você tem todo o tempo que quiser para decidir e discutir a situação com pessoas de sua confiança.

Para sua participação há necessidade do preenchimento do questionário de rotina para doação de amostras de sangue (equivalente a duas colheres cheias), verificação de peso e pressão arterial. Além disso, somente serão aceitos indivíduos que possuam resultado de PCR positivo para Coronavírus ou teste rápido IgM/IgG positivos, que estejam assintomáticos por pelo menos 14 dias antes da coleta. Que não tenha recebido transfusão nos últimos 12 meses. Que durante a infecção, apresentaram sintomas clínicos leves ou com necessidade de internação. Que estejam aptos nas triagens clínica, hematológica e laboratoriais de rotina para doação de sangue.

O senhor será entrevistado por um médico/enfermeiro para registro de informações sobre o tempo e sinais clínicos apresentados durante a infecção. Se o senhor estiver apto nas

triagens anteriores, será coletada uma amostra de seu sangue para a verificação da presença de anticorpos que protegem contra o Coronavírus e ainda uma amostra do interior de suas narinas e garganta para verificar se o seu organismo eliminou completamente o Coronavírus. Se o senhor estiver apto nas triagens acima, serão realizados os exames de outras doenças como Hepatite B, Hepatite C, HIV, Sífilis, Chagas e tipagem sanguínea. Com a aptidão nestes exames, será agendada uma coleta de sangue para o estudo e posteriormente, será realizado a coleta de mais duas amostras de seu sangue, 60 e 90 dias após a primeira coleta de amostra para verificar a concentração de anticorpos contra o Coronavírus e das proteínas presentes no seu corpo.

Você não terá qualquer custo ou qualquer forma de pagamento/remuneração por sua participação neste estudo. Solicitamos sua autorização para armazenarmos uma amostra de seu sangue e plasma para uma nova testagem se for necessário e outros exames que não estejam previstos aqui, mas que sejam necessários para o estudo. O sangue coletado ficará armazenado no biorrepositório da Fundação HEMOAM para futuras análises e avaliações ligadas ao projeto. No caso de amostra insuficiente, quebra do tubo, hemólise, o senhor será avisado para que retorne ao HEMOAM para realizar nova coleta de sangue para a realização dos exames.

Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contatar diretamente Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, pesquisadora do estudo, através do telefone (92) 99114-9478. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. Os membros da equipe do projeto de pesquisa irão garantir que você receba assistência imediata caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Os riscos de participação neste projeto estão relacionados ao desconforto da punção da veia para coleta das amostras. Durante a coleta de sangue o senhor poderá sentir tremores e dormências nos lábios, desconforto no local da coleta e uma mancha vermelha poderá aparecer no local, mas é uma reação normal a coleta de amostras.

Os benefícios de sua participação estão direcionados ao auxílio no entendimento da doença (COVID-19) e o que ela produz no corpo dos pacientes, além de ser possível identificar proteínas que possam demonstrar os pacientes que irão produzir uma resposta eficiente do organismo ao vírus. Essa pesquisa não trará nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas irão ajudar a entender a doença e os pacientes que forem infectados no futuro.

Os exames e procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você. Os acompanhamentos médicos após a doação serão

realizados por telefone; se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não renunciará a nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

Você pode ser excluído do estudo se os pesquisadores considerarem oportuno ou se você solicitar, tanto por razões de segurança, por qualquer desconforto que ocorra ou por considerar que você não está cumprindo os procedimentos solicitados pela equipe do estudo. Em todos os casos, você receberá uma explicação adequada do motivo que ocasionou a sua retirada do estudo. Além disso, o estudo também pode ser cancelado por razões administrativas. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você se compromete a cumprir com os procedimentos do estudo que foram explicados.

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, por favor, entre em contato com o pesquisador responsável do estudo: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, no endereço Av. Constantino Nery, 4397, Bloco E, 1º andar, Chapada, Manaus - AM; telefone (92) 99114-9478 ; e-mail malheiroadriana@yahoo.com.br.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cephemoam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Eu li este documento ou ele foi lido para mim, fico ciente e concordo em fazer a doação.

Eu (nome completo), _____

- Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.
- Recebi informações suficientes sobre o estudo.
- Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.
- Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.
- Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.
- Entendo que receberei uma via deste termo.

9.2 Parecer Consubstanciado do CEP

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).

Pesquisador: Adriana Malheiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30975020.9.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.126.784