UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

DANIELLE ROSA BESERRA

Imunomodulação da expressão de PD-1 em monócitos e linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2

São Paulo

2022

DANIELLE ROSA BESERRA

Imunomodulação da expressão de PD-1 em monócitos e linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato

Coorientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Beserra, Danielle Rosa
Imunomodulação da expressão de PD-1 em monócitos e linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2 / Danielle Rosa Beserra. -- São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientadora: Maria Notomi Sato.
Coorientador: Gil Benard.

Descritores: 1.SARS-CoV-2 2.COVID-19 3.Linfócitos 4.Monócitos 5.Exaustão 6.PD-1/PDL-1

USP/FM/DBD-325/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: Danielle Rosa Beserra

Título da Dissertação: Imunomodulação da expressão de PD-1 em Monócitos e Linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado(a) em: ____/____/_____

Dr:.....

Instituição: .....

Julgamento:.....

Dr:.....

Instituição: .....

Julgamento:.....

Dr:.....

Instituição: .....

Julgamento:.....

Dedico este trabalho às vítimas da COVID-19, em especial ao povo brasileiro, principalmente ao povo negro e povos indígenas. Que a luz da ciência possa nos mostrar a saída em tempos obscuros e caminhos mais justos para todos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Maria, que desde o meu início no Laboratório sempre esteve ao meu lado. Sou grata a todos os ensinamentos, compreensão, apoio e paciência nesta trajetória. A Maria possui qualidades que vão muito além de seu lattes, e graças a isso humanizou de diversas maneiras o meu caminho até aqui. Sempre serei grata. Você me inspira.

À minha família. Minha mãe Carmen Lucia, meu pai Edilson Caetano e ao meu irmão Marcos. Agradeço em especial aos meus pais, que sempre me ensinaram e mostraram o que realmente é valioso. Sem eles eu não estaria aqui hoje e não seria metade de quem eu sou. Foi o esforço, sacrifício e incentivo deles que me possibilitaram sonhar e ter melhores perspectivas que me trouxeram até aqui. Amo vocês!

À minha querida vózinha Carmen Garcia Rosa, que embora não tenha visto os caminhos que eu trilharia, sempre esteve comigo em pensamento e coração. Seu carinho, afeto e amor mesmo que só em minha memória foram sempre o meu acalanto, principalmente nos dias difíceis.

Ao meu companheiro e parceiro Abayomi Alves, que embora não tenha acompanhado todo o processo até aqui, desde que nos conhecemos foi e tem sido o meu apoio em diversos momentos.

A todos os meus amigos da Experimental e agregados: Fran, Nat, Ricardo, Anna Júlia, e Luana, Marina e Fabinho, em especial às minhas queridas amigas Sarah, Emily, Anna C. Júlia, Iara e Yasmin pelo amor, apoio e cumplicidade.

Agradeço à Luana e Ricardo pela paciência em me auxiliar e orientar nas análises de citometria.
À Anna C. Por todos os ensaios de ELISA.

Ao Cyro Brito e Instituto Adolph Lutz pelo espaço para realizar os experimentos e à paciência do Cyro por todas as vezes que precisei ficar no laboratório além do seu horário de trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Telma Oshiro, Dr. Josenilson e Dr. Cyro Brito pelas críticas e sugestões.

Aos funcionários e professores do LIM56 por garantirem um ótimo ambiente de trabalho. Em especial à Dri, Silvinha e Daniel pelo acolhimento que só “quem é” entende.

À secretaria do Departamento de Dermatologia da FMUSP, em especial à Ruth e Marcelo que sempre me auxiliaram nas minhas dúvidas da melhor maneira possível, contribuindo para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Ao Prof.º Alberto Duarte pelo apoio institucional.

E por último, mas com certeza não menos importante, agradeço ao Núcleo Ayé, o Coletivo Negro da Faculdade de Medicina da USP. Espaço no qual me fortaleci e me fortaleço todos os dias, onde pela primeira vez realmente me senti parte da Faculdade, onde me senti realmente acolhida e representada. Foi esse espaço que muitas vezes me deu forças para não desistir. Agradeço a todos os meus amigos do coletivo que foram a minha força em muitos momentos. Em especial agradeço à Gláucia Verena e Merllin de Souza por terem fundado o Núcleo Ayé. Também agradeço à Larissa Alexandre por toda amizade, identificação e parceria. Vocês são minhas irmãs.

Aos meus ancestrais que deram suas vidas para que eu pudesse chegar aqui, uma garota negra, da periferia de Guarulhos oriunda da escola pública. Honrar a nossa luta é o meu principal compromisso.

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha formação e com a realização desse projeto.

Muito obrigada!
UBUNTU!

Ah, comigo o mundo vai modificar-se.
Não gosto dele como é.”

(Carolina Maria de Jesus, O Diário de Bitita, 1977)

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) nº 88887.503842/2020-00.

RESUMO

Beserra DR. Imunomodulação da expressão de PD-1 em monócitos e linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

No final do ano de 2019 um novo coronavírus, o SARS-CoV-2, surgiu em Wuhan na China e rapidamente se tornou responsável pela pandemia da COVID-19. Atualmente já foram infectadas mais de 585 milhões de pessoas e registrados mais de 6 milhões de óbitos. A infecção pelo SAR-CoV-2 pode evoluir de forma assintomática ou com sintomas mais graves muitas vezes associados a comorbidades. O SARS-CoV-2 possui diversos mecanismos que ocasionam a depleção e exaustão de linfócitos causada pela expressão de moléculas inibidoras de *checkpoint* como PD-1 e seu ligante PD-L1 que suprimem a função efetora destas células, relacionando com a gravidade da doença. Neste estudo avaliamos a expressão de PD-1 e PD-L1 em células TCD4+, TCD8+, CD19+, monócitos CD14+ e as formas solúveis no soro de 125 pacientes moderados (n= 70), graves (n=16) e críticos (n=39) da COVID-19 procedentes do HC-FMUSP. No período de maio de 2020 à setembro de 2021. Observamos a prevalência de 17% de óbitos nos pacientes moderados, 6% nos pacientes graves e 50% nos pacientes críticos. As comorbidades mais observadas foram de hipertensão arterial sistêmica/distúrbios cardiovasculares e diabetes. Foi observada linfopenia nos pacientes graves e críticos e diminuição da frequência de linfócitos em pacientes moderados, graves e críticos. Aumento da frequência do de linfócitos TCD4+ que expressam marcador de memória CD45RO foi observado em pacientes moderados, graves e críticos. Já o aumento de PD-1 foi observado somente em pacientes graves e críticos, sendo que o aumento da expressão de CD19+ PD1+ também foi detectado nos pacientes moderados. Não foi observado alteração em células TCD8+ quanto a expressão de CD45RO e /ou PD-1 Quanto aos monócitos CD14+ que desempenham importante papel na resposta imune pelo seu perfil pró-inflamatório, observamos diminuição de frequência em pacientes moderados em relação aos controles. Já o aumento da expressão de PD-1 em monócitos CD14+ foi observado somente em pacientes graves e críticos, associado ao tempo de infecção. No soro dos pacientes observamos o aumento dos níveis de PD-L1 solúvel nos pacientes graves e críticos, o que está diretamente associado com a maior expressão de PD-1 nas populações estudadas. Em conjunto, estes dados elucidam a importância do eixo PD-1/PD-L1 na evolução da COVID-19 e podem fornecer um maior entendimento dos fatores associados à gravidade da infecção.

Palavras chave: SARS-CoV-2. COVID-19. Linfócitos. Monócitos. Exaustão. PD-1/PDL-1.

ABSTRACT

Beserra DR. Immunomodulation of PD-1 expression on monocytes and T and B lymphocytes in SARS-CoV-2 infection [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

In late 2019 a new coronavirus, SARS-CoV-2, emerged in Wuhan in China and quickly became responsible for the COVID-19 pandemic. Currently more than 585 million people have been infected and more than 6 million deaths have been recorded. SARS-CoV-2 infection can progress asymptomatically or with more severe symptoms often associated with comorbidities. SARS-CoV-2 has several mechanisms that cause depletion and exhaustion of lymphocytes caused by the expression of checkpoint inhibitor molecules such as PD-1 and its ligand PD-L1 that suppress the effector function of these cells, relating it to the severity of the disease. In this study we evaluated the expression of PD-1 and PD-L1 in TCD4+, TCD8+, CD19+ cells, CD14+ monocytes and the soluble forms in the serum of 125 moderate (n= 70), severe (n=16) and critical (n=39) COVID-19 patients from HC-FMUSP. In the period from May 2020 to September 2021. We observed a prevalence of 17% of deaths in moderate patients, 6% in severe patients and 50% in critical patients. The most observed comorbidities were hypertension/cardiovascular disorders and diabetes. Lymphopenia was observed in the critically ill and critically ill patients and decreased lymphocyte frequency in moderate, critically ill and critically ill patients. Increased frequency of TCD4+ lymphocytes expressing the memory marker CD45ROwas observed in moderate, severe, and critical patients. An increase in PD-1 was observed only in critically ill and severe patients, and increased expression of CD19+ PD1+ was also detected in moderate patients. No alteration was observed in TCD8+ cells regarding the expression of CD45RO and/or PD-1. As for CD14+ monocytes, which play an important role in the immune response because of their pro-inflammatory profile, we observed a decrease in frequency in moderate patients compared to controls. The increased expression of PD-1 in CD14+ monocytes was observed only in severe and critical patients, associated with the time of infection. In patient serum, we observed increased levels of soluble PD-L1 in critically ill patients, which is directly associated with higher PD-1 expression in the populations studied. Taken together, these data elucidate the importance of the PD-1/PD-L1 axis in the evolution of COVID-19 and may provide a greater understanding of the factors associated with infection severity.

Keywords: SARS-CoV-2. COVID-19. Lymphocytes. Monocytes. Exhaustion. PD-1/PDL-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.. Apresentação esquemática do eixo PD-1/PD-L1. Adaptado de Ashrafizadeh, Milad, et al. 2020. 23
Figura 2. Estratégia de análise de linfócitos TCD4 em sangue periférico. 30
Figura 3.Estratégia de análise de linfócitos TCD8 em sangue periférico. 31
Figura 4. Estratégia de análise de linfócitos B em sangue periférico. 32
Figura 5.Estratégia de análise de Monócitos em sangue periférico. 33
Figura 6.Representação gráfica dos dados demográficos dos pacientes com SARS-CoV-2... 36
Figura 7.Comorbidades da coorte de pacientes acometidos com a COVID-19. 37
Figura 8.Diminuição da frequência de linfócitos totais nos pacientes com estado clínico moderado e grave/crítico na infecção por SARS-CoV-2. 39
Figura 9.Aumento da frequência da expressão de PD1 e CD45RO em linfócitos T CD4+ em indivíduos com a COVID-19. 40
Figura 10.Frequência da expressão de PD-1 e CD45RO em linfócitos T CD8+ em indivíduos com a COVID-19. 41
Figura 11.Aumento da frequência da expressão de marcadores de exaustão em linfócitos B em indivíduos com a COVID-19. 42
Figura 12. Aumento da frequência da expressão de marcadores de exaustão em monócitos em indivíduos com a COVID-19. 43
Figura 13. Frequência da expressão de marcadores de memória e exaustão em linfócitos TCD4+, TCD8+ e CD19+ no período de 1-7 dias e 8-20 dias de PCR+ em indivíduos com COVID-19.45
Figura 14. Aumento dos níveis de PDL-1 no soro de pacientes graves/críticos infectados por SARS-CoV-2. 46
Figura 15. Ausência de correlação entre títulos de PDL-1 no soro e de indicadores de gravidade em pacientes com a COVID-19. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.Classificação da coorte de pacientes com a COVID-19 e controles saudáveis utilizados no estudo. 28
Tabela 2. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de linfócitos TCD4+ e T CD8+ por citometria de fluxo 29
Tabela 3. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de linfócitos B/CD19+ por citometria de fluxo 29
Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de monócitos/CD14+ por citometria de fluxo 29
Tabela 5. Dados demográficos dos pacientes acometidos com SARS-CoV-2 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL Microlitro

ACE2 Enzima Conversora da Angiotensina 2 (do inglês: *Angiotensin-converting enzyme 2*)

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês: *antigen-presenting cell*)

CD Cluster de diferenciação

COVID-19 Doença por coronavírus 2019 (do inglês: *Coronavirus Disease 2019*)

CS Controle saudável

DAMP Padrões Moleculares Associados a dano (do inglês: *Danger Associated Molecular Patterns*)

DC Dendritic cells *(células dendríticas)*

DLC Divisão de Laboratório Central

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês: *ethylenediaminetetraacetic acid*)

F Feminino

FSC Do inglês: *Forward SCatter*

HAS Hipertensão Arterial Sistêmica

HC-FMUSP Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN Interferon

IL Interleucina (do inglês: *Interleukin*)

IRF Fatores Regulatórios de Interferon (do inglês: *Interferon Regulatory Factors*)

M Masculino

MERS Síndrome Respiratória do Oriente Médio (do inglês: *Middle East respiratory syndrome*)

mL Mililitro

NK Célula Natural Killer

NLRP3 Domínio pirina da família NLR contendo 3

NSP Proteína não estrutural (do inglês: *nonstructural protein)*

PAMP Padrão Molecular Associado a Patógenos (do inglês: *Pathogen-associated molecular patterns*)

PBMC Células Mononucleares de Sangue Periférico (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS Tampão Fosfato Salina (do inglês: *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR Proteína C Reativa

PD-1 Proteína 1 de Morte celular programada (do inglês: *Programmed Cell Death Protein 1*)

PDL-1 Ligante da proteína 1 de morte celular programada

PRR Receptor de Reconhecimento Padrão (do inglês: *Pattern Recognition Receptors*)

RNA Ácido ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic acid*)

RT-PCR Transcriptase reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *reverse transcription-polymerase chain reaction*)

SARS-CoV-2 Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (do inglês: *Sev[illegible]cute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SEM Do inglês: *standard error of the mean*

sPD-1 Proteína 1 de Morte celular programada solúvel

sPDL-1 Ligante da proteína 1 de morte celular programada solúvel

SSC Do inglês: *Side Scatte*

TLR Receptor do Tipo Toll (do inglês: *Toll-like receptor*)

TMPRSS2 Serinoprotease transmembrana 2 humana (do inglês: *transmembrane serine protease 2*)

TNF Fator de Necrose Tumoral (do inglês: *Tumor necrosis fator*)

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VHB Vírus da Hepatite B

VHC Vírus da Hepatite C

WHO Organização Mundial da Saúde (do inglês: World Health Organization)

SUMÁRIO

1.Introdução 18

1.1. Pandemia da COVID-19 18

1.2. Infecção pelo SARS-CoV-2 19

1.4. Função dos Linfócitos na infeção por SARS-CoV-2 21

1.5 O eixo PD-1/PD-L1 na COVID-19 22

2.Objetivos 26

2.1. Objetivos específicos 26

3. Materiais e Métodos 27

3.1 Casuística e seleção das amostras 27

3.2. Análise fenotípica de linfócitos T CD4+, T CD8+, CD19+ e monócitos CD14+ em sangue periférico por citometria de fluxo 28

3.3. Dosagem de PD-1 e PD-L1 solúvel 33

3.4. Análise estatística 33

4. Resultados 35

4.1 Perfil clínico dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 35

4.2 Análise fenotípica de linfócitos totais na COVID-19 39

4.3 Análise fenotípica de populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+ 39

4.4 Análise fenotípica de populações de linfócitos B 42

4.5 Avaliação fenotípica de Monócitos CD14+ 42

4.6 Análise fenotípica de linfócitos TCD4+, TCD8+ CD19+ e Monócitos CD14+ em pacientes com a COVID-19 em relação ao tempo de infecção 43

4.7 Avaliação dos níveis séricos de PD-1 e PD-L1 solúveis 45

4.8 Análise da correlação de sPD-L1 com marcadores laboratoriais associados a gravidade na infecção por SARS-CoV-2 46

5. Discussão 48

6. Conclusão 52

7. Referências Bibliográficas 53

8. Anexos 67

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles 68

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pacientes COVID-19 70

APÊNDICE C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA..... 72

1.Introdução

1.1. Pandemia da COVID-19

Os coronavírus (CoV), são vírus de RNA (ácido ribonucleico) pertencentes a família *coronaviridae* e subfamília *coronavirinae*, apresentam os gêneros *alphacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus e deltacoronavirus*, e podem causar doenças respiratórias e intestinais em animais e seres humanos (V'kovski, et. al, 2020). Nos anos de 2002 e 2003 foi responsável pelo surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS) em Guangdong, China e em 2012 pela síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) (Cui, Li e Shi, 2018). No final de 2019 em Wuhan, na China, foi relatado o surgimento de um novo betacoronavírus altamente patogênico, causador da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), responsável pela atual pandemia da doença coronavírus 2019 (COVID-19), que se tornou uma ameaça a vida humana e segurança pública no mundo (Sun, et. al, 2020). Até o dia15 de agosto de 2022 já foram registrados 585.950.085 milhões de casos e 6.425.422 milhões de mortes pela COVID-19 (WHO, 2022).

Com o avanço da pandemia variantes de interesse do SARS-CoV-2 (VOIs) surgiram. As VOIs apresentam marcadores genéticos específicos associados a alterações que podem causar maior transmissibilidade ou virulência, redução na neutralização por anticorpos obtidos por meio de infecção natural ou vacinação e capacidade de evitar a detecção do vírus. Até o presente momento foram descritas as seguintes variantes: a variante Zeta (P.2) detectada pela primeira vez no Brasil em abril de 2020; a variante Epsilon (B.1.427 e B.1.429) que surgiu no EUA por volta de junho de 2020 e apresentou maior transmissibilidade; as variantes Eta (B.1.525) e Iota (B.1.526) detectadas pela primeira vez em Nova York em novembro de 2020, que mostraram potencial na redução da neutralização por tratamentos com anticorpos e soros vacinais; a variante Delta (B.1.617.2) relatada pela primeira vez na Índia em dezembro de 2020, a variante Theta (P.3) detectada pela primeira vez nas Filipinas e Japão em fevereiro de 2021, a variante Lambda (C.37) detectada pela primeira vez no Peru em junho de 2021, a variante Kappa (B.1.617.1) detectada pela primeira vez na Índia em dezembro de 2021, a variante Um (B.1.621) identificada na Colômbia em agosto de 2021 e mais recentemente a variante Omicron (B.1.1.529) relatada pela primeira vez na África do Sul em novembro de 2021, que se mostrou 2,8 vezes mais infeccioso do que a variante Delta (Abdul Aleem et al. 2022).

O esforço de pesquisadores ao redor do mundo possibilitou o desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19 em uma velocidade impressionante. A primeira vacina aprovada

contra a COVID-19 foi a BNT162b2 (Pfizer) baseada em mRNA (Lamb, Yvette N. 2021), aprovada em dezembro de 2020 no Reino Unido e em fevereiro de 2021 no Brasil. Desde então outras vacinas de diferentes modelos vacinais foram aprovadas. No Brasil, até o presente momento, também foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as vacinas Coronavac (Sinovac Biotech), que utiliza o vírus inativado (Wu, Zhiwei, et al. 2021), a vacina Janssen (Janssen-Cilag) que utiliza vetores de adenovírus sorotipo 26 (Ad26) (Stephenson, Kathryn E., et al. 2021) e a vacina Astrazeneca que usa vetor adenovírus recombinante (Hung, Ivan F. N. et al. 2021). Mundialmente já foram aplicadas 12.248.795.623 bilhões de doses de vacina contra a COVID-19, sendo que 5.297.790.548 bilhões de pessoas foram vacinadas com ao menos uma dose e 4.834.946.693 bilhões de pessoas com as duas doses da vacina (WHO, 2022). No Brasil, até o dia 24 de julho de 2022 foram aplicadas mais de 465 milhões de doses, onde 170 milhões de pessoas receberam a segunda dose ou dose única (Ministério da Saúde, 2022).

1.2. Infecção pelo SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é formado por quatro proteínas estruturais, a proteína do nucleocapsídeo (N), proteína de pico/*spike* (S), proteína de envelope (E) e a proteína de membrana (M) que são responsáveis por se ligarem ao genoma do RNA para formar o nucleocapsídeo, pela ligação a receptores da célula hospedeira para mediar sua entrada, formação do envelope viral e organização e montagem do vírus, respectivamente (Seah, Su e Lingam, 2020). Além disso, possui dezesseis proteínas não estruturais (nsp1 à nsp16) (Chan, et. al, 2020), responsáveis pelo processamento e replicação do RNA viral, sinalização de sobrevivência da célula hospedeira, separação da proteína traduzida, modificação das membranas do RE (retículo endoplasmático), participação do processo de poliproteína durante a replicação, transcrição do vírus, etc. (Wang et. al 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre principalmente por contato com gotículas respiratórias de indivíduos infectados ou com fômites. Também pode ser transmitido por via fecal-oral, por via sanguínea e por aerossóis presentes no ar (WHO, 2020). O vírus majoritariamente entra em contato e infecta células epiteliais das vias aéreas respiratórias do hospedeiro (Thevarajan et. al, 2020). A infecção é estabelecida pela ligação da proteína S do coronavírus, composta por duas subunidades (S1 e S2), no receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina) e na protease transmembranar serina 2 (TMPRSS2) presente na célula do hospedeiro. Atua na clivagem e ativação da proteína S promovendo a absorção e fusão do vírus

na membrana celular ou endossomal (V'kovski et al. 2020). Após, ocorre a liberação e desencapsulamento do RNA gênomico que será traduzido pelas proteínas ORF1a e ORF1b, resultando nas poliproteínas pp1a e pp1ab que formam o complexo de transcrição e replicação. Neste microambiente, o RNA genômico viral e a transcrição de mRNAs subgenômicos (mRNAs de sg) responsável por codificar todas as proteínas virais, possibilita a montagem do nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo então, brotará no lúmen da cavidade intermediária RE-Golgi (ERGIC) e por exocitose ocorre a liberação de partículas de vírus (Li et. al, 2020).

A entrada do SARS-CoV-2 na célula do hospedeiro e seu processo de replicação ocasiona o vazamento de Ca^{2+} do citosol para o Complexo de Golgi, concomitantemente a proteína acessória ORF3a do SARS-CoV-2. Este induz o efluxo de K^{+} da célula hospedeira para o meio extracelular, causando seu desequilíbrio iônico, desencadeando ROS (espécies reativas de oxigênio). A ORF3a também promove a ubiquitinação da proteína adaptadora do inflamassoma AS, mediada por TRAF3, e pode interagir diretamente com o domínio rico em leucina de NLRP3 (domínio pirina da família NLR contendo 3), levando à ativação do inflamassoma que induz a formação de poros na membrana celular do hospedeiro, promovendo a secreção de citocinas pró inflamatórias dentre elas a IL-1β e IL-18. Já o efluxo de moléculas de H_2O consequente da porosidade celular leva ao inchaço da célula conduzindo-a a piroptose (Chen, Moriyama, et al 2019; Ren, Shu, Wu et al. 2020). Esse processo resulta na liberação de DAMPs (padrões moleculares associados a danos), como ácidos nucleicos, ATP e oligômeros ASC, e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) que são reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos alveolares que passam a liberar citocinas e quimiocinas. Entre elas, IL-6, IP-10, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP1α e MIP1β) e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), que por sua vez atraem monócitos, macrófagos e células T, produtoras de IFNγ, para o local da infecção, promovendo mais inflamação **(**Zhang et. al, 2020). Entretanto, foi observado que a rápida replicação viral do SARS-CoV-2 consegue evitar a ativação da resposta imune inata do hospedeiro durante suas etapas iniciais por ação de suas proteínas virais ORF6, ORF8 e as proteínas do nucleocapsídeo que inibem a via de sinalização do interferon tipo I e do promotor responsivo a NF-κB (Li, Liao et al. 2020). Além disso, a secreção de IL-1β e IL-18 em conjunto com o substrato de caspase-1 gasdermina D (GSDMD) e lactato desidrogenase (LDH) liberados durante a piroptose por monócitos e macrófagos pulmonares infectados, contribuem para a excessiva inflamação e gravidade na COVID-19 (Brewer, R. Camille, et al. 2022). Outro fator associado a gravidade na COVID-19 é a expressão reduzida de HLA-DR em monócitos (Silvin, Aymeric, et al. 2020). Este efeito está relacionado positivamente com os níveis de fatores imunossupressores solúveis como IL-

10, TGF-β, VEGFA e AREG (Kvedaraite, Egle, et al. 2021), contribuindo com os níveis de carga viral, e a gravidade da doença (Amor, Blanco e Baker, 2020).

Essa supressão inicial da resposta imune inata causa amplificação das respostas pró-inflamatórias, levando ao acumulo de células imunológicas nos pulmões, que desencadeia uma cascata de produção de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando danos aos alvéolos pulmonares. Além disso, a tempestade de citocinas pode atingir outros órgãos e também causar danos (V'kovski et.al, 2020).

1.4. Função dos Linfócitos na infeção por SARS-CoV-2

Na resposta imune adaptativa contra o SARS-CoV-2 os linfócitos desempenham papel crucial no prognóstico da doença. Os linfócitos B atuam, sobretudo, na produção de anticorpos neutralizantes, tendo como principal alvo a porção RBD da proteína S do SARS-CoV-2 (Thevarajan et al., 2020; Brouwer et al., 2020). Contudo, a persistência da imunidade humoral em pacientes assintomáticos, moderados e graves pode variar (Dan et al., 2021; Long, Liu et al., 2020; Pierce, Preston-Hurlburt et al., 2020). A imunidade humoral de longo prazo é dependente de dois tipos celulares derivados de CGs (centros germinativos), as células plasmáticas de vida longa que secretam anticorpos de maneira contínua e as células B de memória (MBCs), que podem se diferenciar em células secretoras de anticorpos após uma nova infecção (Amanna, Carlson e Slifka, 2007; Crotty, Felgner, et al., 2003). MBCs que produzem anticorpos neutralizantes são observadas em pacientes convalescentes para a COVID-19 até 15 meses após a infeção, os níveis de anticorpos variaram de acordo com a gravidade da doença, sendo mais elevados em pacientes acometidos pela doença grave do que pacientes com os sintomas leves (Marcotte, Harold, et al. 2022). A resposta de anticorpos IgG e títulos de neutralização diminuem 15 a 28 dias após a infecção, estabilizam após 6 meses. Ciclos repetidos de CGs e maturação de afinidade sugerem que a qualidade de anticorpos gerados aumenta com o passar do tempo (Wang et al., 2021). Além disso, a forte ativação extrafolicular das células B em pacientes sintomáticos pode prevenir ou atrasar uma resposta imune dependente de CGs (Woodruff, et al., 2020). Embora a resposta humoral seja imprescindível no combate a COVID-19 segue em aberto a durabilidade da resposta de anticorpos específicos para o SARS-CoV-2.

Os linfócitos TCD8+ desempenham papel citotóxico agindo diretamente na eliminação da célula infectada (Peng et. al, 2020). Na fase aguda da COVID-19 células T CD8+ específicas para SARS-CoV-2 mostram altos níveis de moléculas ligadas a funções efetoras citotóxicas,

como IFNγ, granzima B, perforina e CD107a, importantes para o prognóstico da doença (Moderbacher et. al, 2020). Já a resposta de células TCD4+ contra o SARS-CoV-2 é caracterizada principalmente pela produção de IFNγ, TNF e IL-2, gerando uma resposta de perfil Th1 (Weiskopf et. al, 2020). Esse perfil pró-inflamatório pode contribuir para a gravidade da doença, contudo, as células TCD4+ são cruciais para o controle da SARS. A rápida indução de células TCD4 $^{+}$ durante a fase aguda está associada a doença leve (Tan et al. 2020), já a ausência de células TCD4 $^{+}$ está associada a doença grave ou fatal (Braun et al., 2020). Além disso, são geradas diferentes células TCD4+ específicas para o vírus que irão desempenhar diversas funções auxiliares e efetoras. As células Th1 pela produção de IFNγ desempenham uma resposta anti-viral, células T auxiliares foliculares (Tfh) que são importantes para auxiliar as células B na maturação de afinidade e produção de anticorpos. Além disto, há as células TCD4+ que auxiliam na proliferação de células TCD8+, as células T CD4-citotóxicas que podem ser citotóxicas contra as células infectadas e as células TCD4+ produtoras de IL-22 que desempenham papel importante no reparo tecidual (Sette e Crotty, 2021).

Pacientes com COVID-19 mostram importantes alterações imunológicas decorrentes pelo SARS-CoV-2, como neutrofilia, tempestade de citocinas e a depleção e exaustão de linfócitos, o que pode favorecer também a infecção direta de células T através do receptor ACE2 (Yang et al., 2020). A capacidade do SARS-CoV-2 de destruir diretamente órgãos linfáticos, como o baço e o nódulo linfático, é observada pela atrofia do baço e necrose de nódulos linfáticos, causando ainda mais linfopenia (Li, Chen, et al., 2020). Além disso, a diminuição do número de células T mostra uma correlação inversa com os níveis de TNFα, IL-6 e IL-10 indicando que a tempestade de citocinas inflamatórias pode promover a depleção e exaustão desses linfócitos (Moon, 2020). Também é descrito que pacientes COVID-19 com níveis elevados de ácido lático possuem maior risco de morte intra-hospitalar (Bahl et al., 2020). Altos níveis deste marcador já foram associados com a inibição da ativação e proliferação de linfócitos T em tumores, prejudicando suas funções efetoras (Fischer et al., 2007).

1.5 O eixo PD-1/PD-L1 na COVID-19

O receptor inibitório de morte programada 1 (PD-1) e seu ligante de morte programada 1 (PDL-1) são importantes mediadores da tolerância imunológica central e periférica e de exaustão imunológica. O PD-1 é expresso em diferentes células imunes, como linfócitos T e B, células natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos, sendo um dos principais marcadores de inibição e exaustão de células do sistema imune (Ahmadzadeh,

Mojgan, et al. 2009). Quando ocorre a ligação de PD-L1 com o PD-1 expresso nas células, as vias de sinalização como PI3K/Akt são inibidas através da supressão da fosforilação de PIP2 a PIP3, causando a redução da proliferação dos linfócitos, estimulação da apoptose e aumento da exaustão de linfócitos e outras células que expressam PD-1. A via de sinalização Ras/MEK/ERK também é afetada pelo eixo PD-1/PD-L1, inibindo a proliferação e diferenciação de células T, por meio da desfosforilação de LCK e ZAP-70 que inibe a via MHC-TCR. Além disso, o eixo PD-1/PD-L1 influencia o metabolismo das células através da supressão da glicólise, direcionando as células para o uso da lipólise e oxidação de ácidos graxos para o metabolismo, contribuindo para o quadro de exaustão das células (Ashrafizadeh, Milad, et al. 2020).

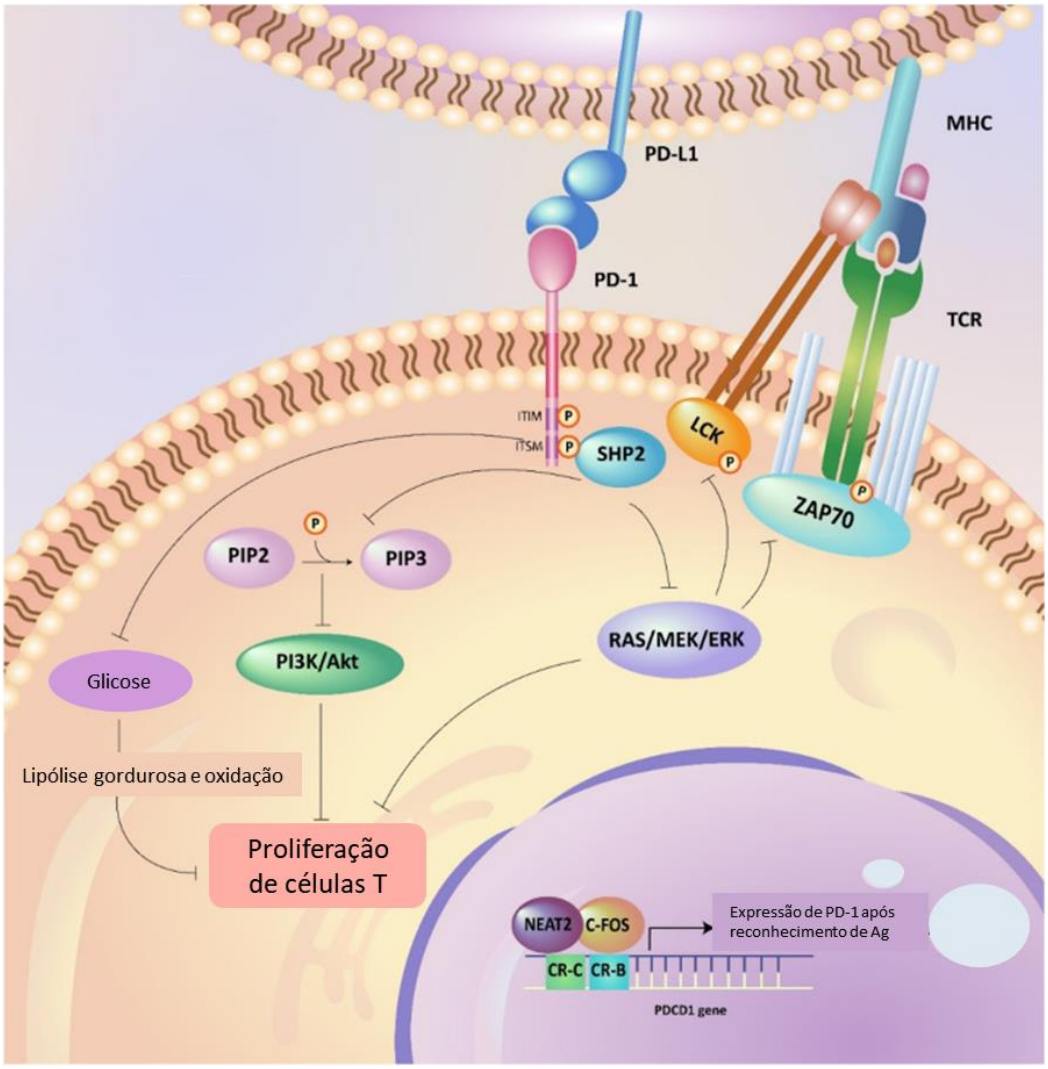

Figura 1. Apresentação esquemática do eixo PD-1/PD-L1. Adaptado de Ashrafizadeh, Milad, et al. 2020.

Nos monócitos a expressão de PD-1 afeta transportadores de glicose, assim a expressão de moléculas glicolíticas são reduzidas e afetam o metabolismo da célula, diminuindo sua capacidade fagocítica (Qorraj, M., et al. 2017). Além disso, o aumento da expressão de PD-1 em monócitos é associado com a gravidade em patologias como carcinoma hepatocelular (Yun, Jin, et al. 2020) e disfunções imunometabólicas de monócitos na leucemia linfocítica crônica (Qorraj, M., et al. 2017), considerado um importante marcador de prognóstico. Contudo, a influência do eixo PD-1/PD-L1 em monócitos na COVID-19 ainda não está estabelecida.

Em linfócitos a expressão de altos níveis de PD-1 é a principal característica de exaustão dessas células (Sakuishi et al., 2010). Altos níveis de PD-1 em células T são associados a exaustão em infecções virais como HIV, Hepatite B e Hepatite C (Day et al., 2006; Urbani S. et al. 2006; Boettler et al., 2006). Em células TCD8+ a alta expressão de PD-1 acarreta na incapacidade da secreção de citocinas, impede a proliferação celular e diminui sua capacidade citotóxica (Parry et al., 2005; Hui et al., 2017). Altos níveis de expressão de PD-1 em células TCD4+ também estão relacionados com a inibição da proliferação celular e diminuição de suas funções efetoras. Também, é descrito que linfócitos B com altos níveis de expressão de PD-1 são capazes de suprimir linfócitos TCD4+ e TCD8+ por meio da via dependente de PD-1 e PD-L1 (Wang et al., 2019). Outro marcador associado à exaustão de células T é a imunoglobulina mucina de células T (Tim-3), que é expresso principalmente em células Th1 e TC1 secretoras de IFN-γ. A interação de Tim-3 com seu ligante, galectina-9, é capaz de induzir a morte celular em células T (Monney et al. 2002). Pacientes infectados por HIV mostram regulação positiva de Tim-3 em células TCD8 exauridas (Jones, et al. 2008), como também em pacientes infectados por HCV (Golden-Mason et al. 2009). Em ambos os estudos o bloqueio de Tim-3 é capaz de restaurar a proliferação de células T e aumentar a produção de citocinas.

O bloqueio da via PD-1 também já se mostrou eficaz na restauração da proliferação e ação efetora de células T. Estudos em camundongos mostraram que o bloqueio de PD-1 foi capaz de aumentar a migração de células T para tumores, elevando quimiocinas induzíveis por IFN-γ (Peng et al. 2012). Também foi demonstrado em camundongos que o bloqueio de PD-1 em Tregs foi capaz de restaurar a proliferação de células TCD8+, além de reduzir a produção de citocinas como TGF-β e IL-10 em tumores (Duraiswamy et al. 2013). Em infecções virais, o bloqueio da via de PD-1 também foi capaz de reverter a exaustão de células T. Na infecção por HIV o bloqueio *in vitro* de PD-1 em células TCD4+ e TCD8+ levou ao aumento da proliferação, produção de citocinas e sobrevida (Day et al., 2006). Em camundongos humanizados infectados com HIV o bloqueio das interações PD-1 e PD-L1 por anticorpos anti-PD-L1 foi capaz de elevar os números de células TCD4+ e TCD8+ e reduzira carga viral

plasmática de HIV **(**Trautmann et al., 2006). O bloqueio *in vitro* de PD-1 e PD-L1 na infecção por HCV, foi capaz de aumentar a proliferação e função efetoras de células TCD8+ específicas para HCV **(**Golden-Mason L. et al., 2013).

Na infecção por SARS-CoV-2 células TCD4+ e TCD8+ apresentam exaustão, fator diretamente associado com o aumento da expressão de PD-1 e Tim-3 na superfície dessas células (Diao et al., 2020). Também foi demonstrado que pacientes com COVID-19 que evoluíram à óbito possuíam expressão significativamente aumentada de PD-1 e Tim-3 em células TCD4+ e TCD8+. O aumento da expressão de PD-1 e Tim-3 também foi observada em células TCD4+ produtoras de IFN-γ de pacientes convalescentes após 1 ano da infecção por SARS-CoV-2, mostrando perda de sua multifuncionalidade (Hou, Zhang et al. 2021). Em monócitos, a via PD-1/PD-L1 também pode causar inibições no metabolismo e funcionabilidade. Um estudo de caso demonstrou que o bloqueio de PD-1 em paciente com melanoma metastático infectado com SARS-CoV-2 levou à recuperação do paciente sem sequelas da COVID-19 (Pala, Laura, et al. 2021). O bloqueio de PD-1 em pacientes convalescentes da COVID-19 foi capaz de reverter anormalidades imunes, por estimular a resposta imune (Loretelli, Cristian, et al. 2021).

Com isso, tendo em vista a importância do eixo PD-1/PD-L1 em diversas patologias e na COVID-19, mais estudos são necessários para analisar o envolvimento desta via no curso da infecção pelo SAR-S-CoV-2.

2.Objetivos

Analisar a expressão de PD1 em monócitos, linfócitos T e B na infecção por SARS-CoV-2. Determinar os níveis séricos de PD1 e PDL1 solúvel.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de PD1 em linfócitos B, linfócitos CD4/CD8+ e monócitos de pacientes moderados, graves e críticos na infecção pela COVID-19 e controles não infectados e não vacinados,
- Determinar os níveis séricos de PD-1 e PD-L1 em pacientes com COVID-19,
- Correlacionar os resultados com os dados laboratoriais e gravidade de doença.

3. Materiais e Métodos

3.1 Casuística e seleção das amostras

Foram utilizadas amostras de sangue em EDTA de pacientes com a COVID-19 provenientes da Divisão Clínica de Laboratório Central (DLC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As amostras foram mantidas a 4ºC e utilizadas no dia seguinte. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP (CAAE 30800520.7.0000.0068-2020). Para critério de inclusão no estudo foram utilizadas somente amostras de pacientes com confirmação do diagnóstico para COVID-19 através da detecção do RNA do SARS-CoV-2 por reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR). Pacientes com idade superior a 75 anos, com neoplasias, transplantados, gestantes e que não possuíam resultados positivos para o SARS-CoV-2 foram excluídos do estudo. Como grupo controle saudável foram selecionados indivíduos sem infecção ativa para SARS-CoV-2 e idade acima de 18 anos. As amostras foram coletadas entre maio de 2020 a setembro de 2021.

Para delimitação dos grupos de estudo a classificação dos pacientes foi realizada de acordo com a *"escala ordinal para melhora clínica"* do documento *"Therapeutic Trial Synopsis"* da Organização Mundial da Saúde (2020), onde são aplicadas pontuações/*score* para classificar os pacientes de acordo com o estado clínico decorrente da COVID-19, conforme a Tabela 1.

Tabela 1.Classificação da coorte de pacientes com a COVID-19 e controles saudáveis utilizados no estudo.

Escala Ordinal para Melhora Clínica			
Classificação coorte de controles e pacientes com COVID-19		**Pontuação**	**Classificação**
Saudável	Controle	.	Controle
Doença leve hospitalizada	Sem oxigenoterapia	3	Moderado
	Oxigênio por máscara ou cânula nasal (CNO2)	4	
Doença grave hospitalizada	Ventilação não invasiva (VNI) ou oxigênio de alto fluxo (CNAF)	5	Grave
	Ventilação mecânica invasiva com suporte de outro órgão (VMI)	6	Crítico
	Ventilação invasiva com suporte de outro órgão (por exemplo, oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO), terpia de substuição renal continua (CRRRT),	7	

A classificação foi realizada de acordo com as diretrizes "Therapeutic Trial Synopsis", WHO, 2020.

3.2. Análise fenotípica de linfócitos T CD4+, T CD8+, CD19+ e monócitos CD14+ em sangue periférico por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada utilizando 100 uL de sangue total periférico coletado em tubos EDTA. As amostras foram incubadas com marcador de viabilidade LIVE/DEAD *Fixable Red Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente e posteriormente incubado com anticorpos de superfície descritos na Tabela 2, 3 e 4 por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram fixadas com formol 4% por 15 minutos e as hemácias foram lisadas com o reagente FACS Lysing (BD Biosciences, Califórnia, USA) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em sequência, as células foram lavadas e ressuspendidas em tampão fosfato (PBS). No citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Biosciences) foram adquiridos aproximadamente 100.00 eventos por amostra. Para análise dos dados obtidos foi utilizado o software FlowJo™. A estratégia de análise de linfócitos TCD4+, TCD8+, CD19+ e monócitos CD14+, estão ilustradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de linfócitos TCD4+ e T CD8+ por citometria de fluxo

Marcador	Fluorôcromo	Clone	Empresa
CD45RO	FITC	UCHL1	Exbio
CD4	V500	RPA-T4	BDBioscence
CD3	BV605	SK7	BDBioscence
CD8	V450	RPA-T8	BDBioscence
PD-1	APC	MIH4	BDBioscence

Tabela 3. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de linfócitos B/CD19+ por citometria de fluxo

Marcador	Fluorôcromo	Clone	Empresa
CD19	PE Cy7	SJ25C1	BDBioscence
CD3	BV605	SK7	BDBioscence
PD-1	APC	MIH4	BDBioscence

Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados para avaliação fenotípica de monócitos/CD14+ por citometria de fluxo

Marcador	Fluorôcromo	Clone	Empresa
PD-1	APC	MIH4	BDBioscence
CD14	PERCP	MOP9	BDBioscence

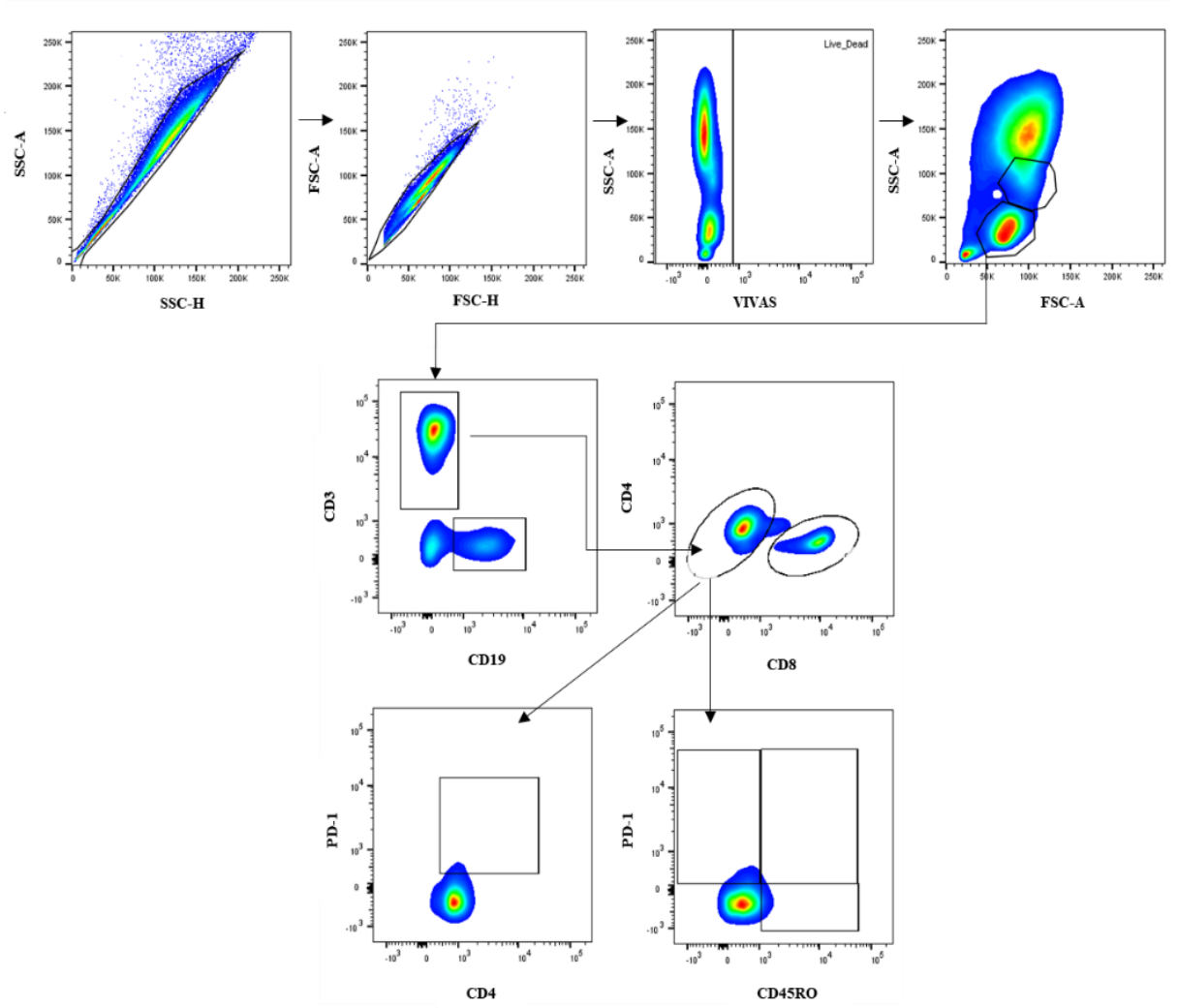

Figura 2. Estratégia de análise de linfócitos TCD4 em sangue periférico.

Primeiramente foram selecionados os *singlets* para SSC e FSC, em seguida a população de células vivas. Dentro da população de células vivas, foi selecionada a população de linfócitos, e posteriormente a população CD3+. Em seguida foi selecionada a população CD4+ onde foram avaliados os marcadores de PD-1 e CD45RO.

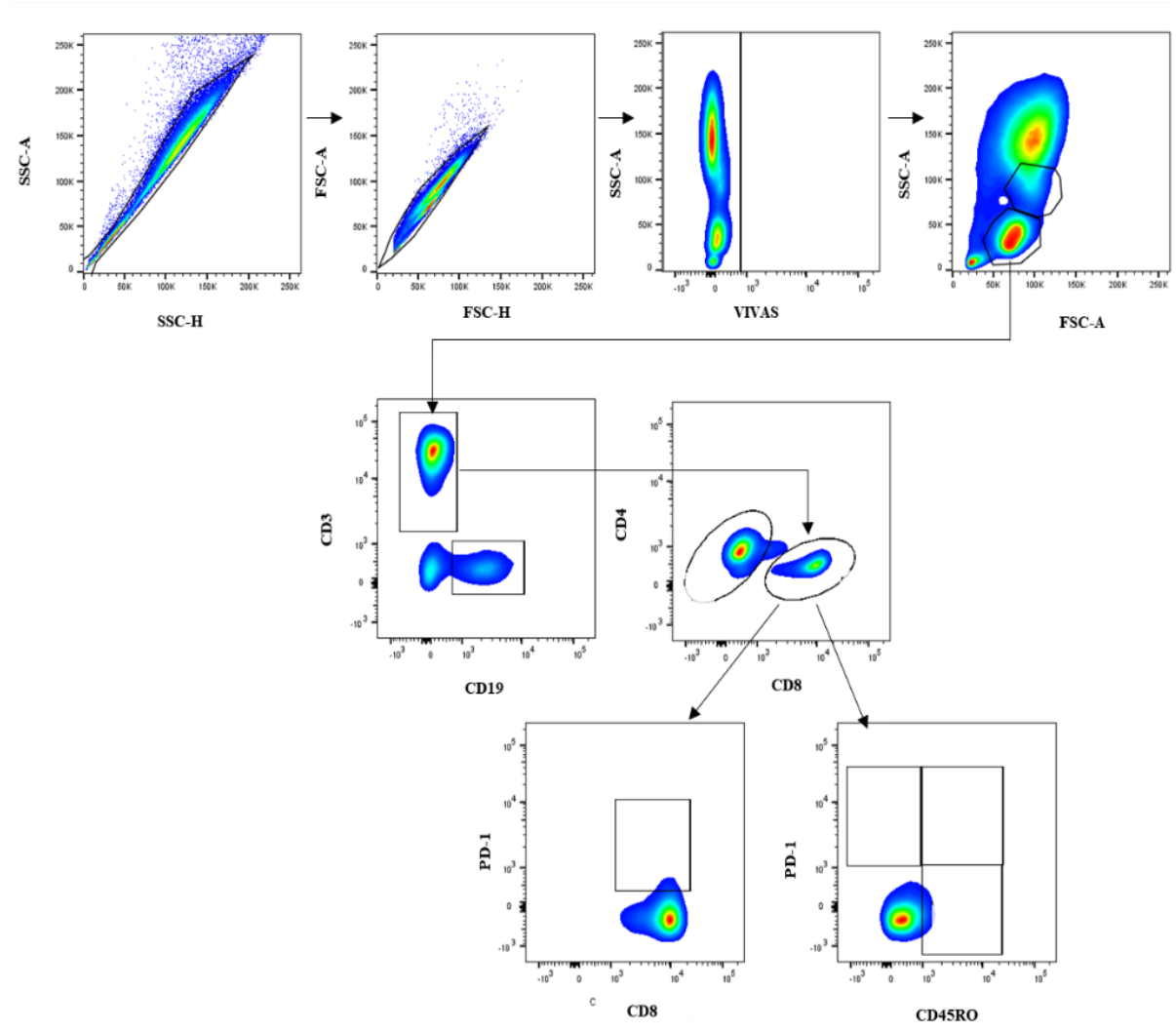

Figura 3.Estratégia de análise de linfócitos TCD8 em sangue periférico.

Primeiramente foram selecionados os *singlets* para SSC e FSC, em seguida a população de células vivas. Dentro da população de células vivas, foi selecionada a população de linfócitos, após a população CD3+. Em seguida foi selecionada a população CD8+ onde posteriormente foram avaliados os marcadores de PD-1 e CD45RO.

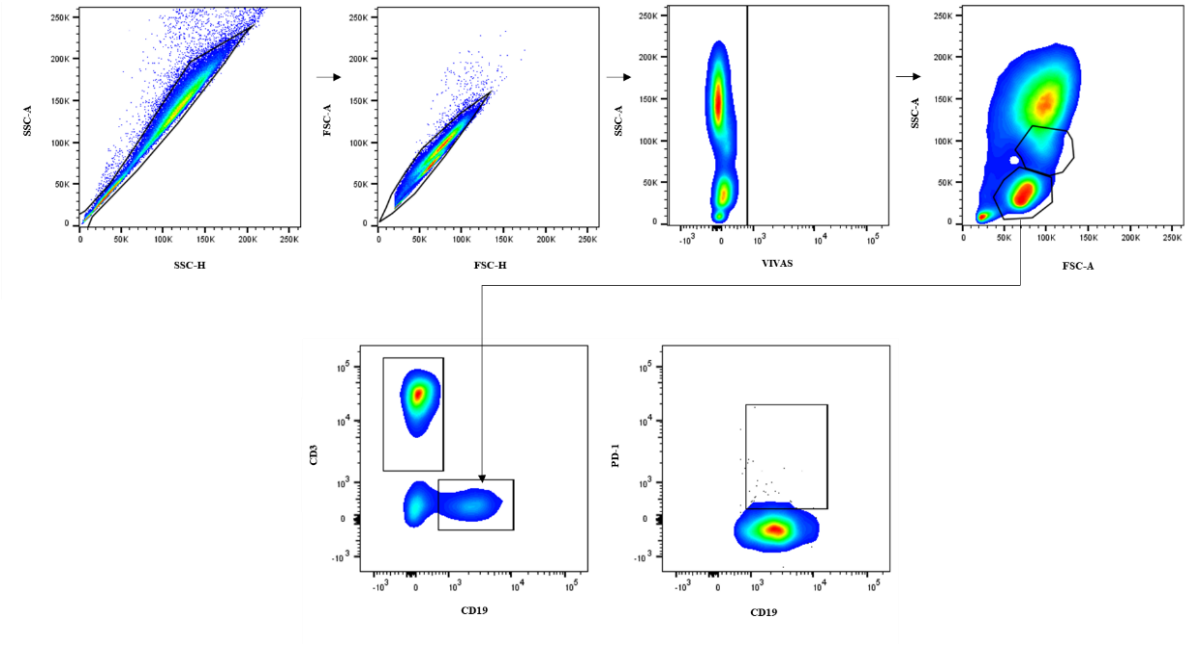

Figura 4. Estratégia de análise de linfócitos B em sangue periférico.

Primeiramente foram selecionados os *singlets* para SSC e FSC, em seguida a população de células vivas. Dentro da população de células vivas, foi selecionada a população de linfócitos, após a população CD3+. Em seguida foi selecionada a população CD19+ onde posteriormente foram avaliados o marcador de PD-1.

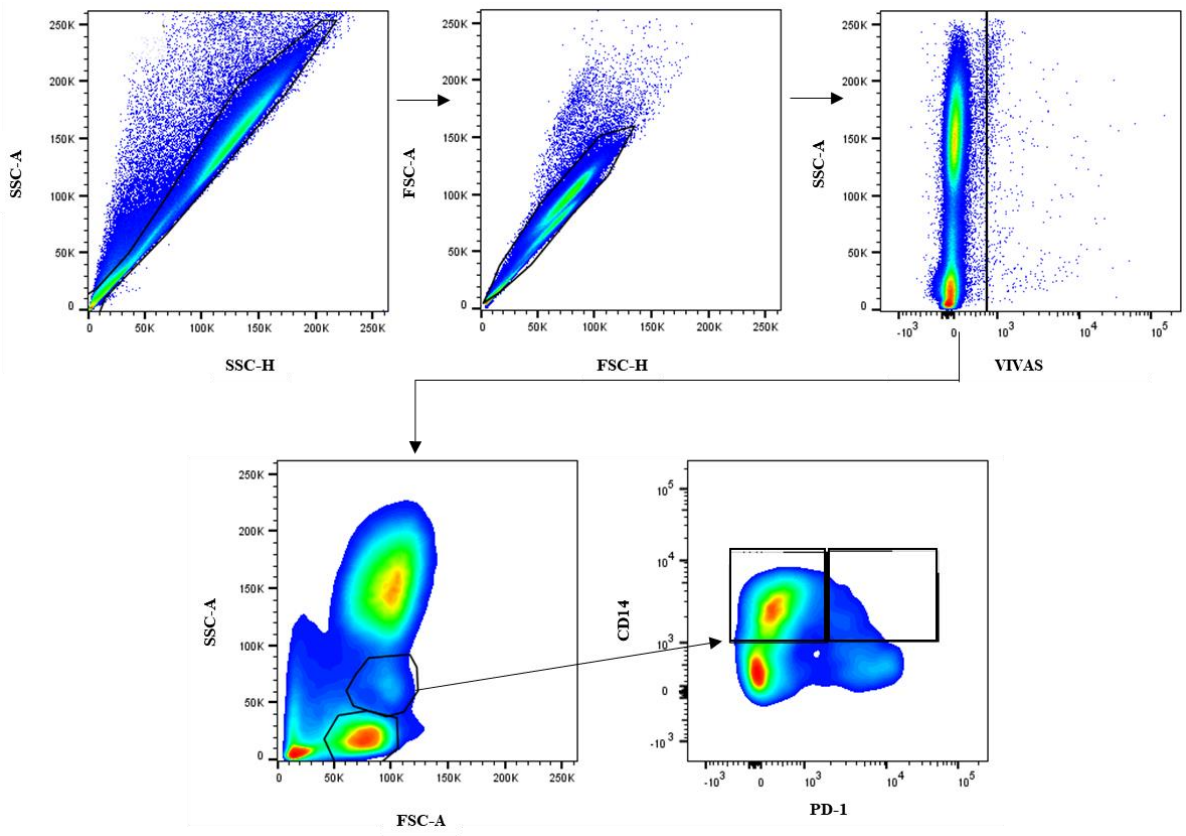

Figura 5.Estratégia de análise de Monócitos em sangue periférico.

Primeiramente foram selecionados os *singlets* para SSC e FSC, em seguida a população de células vivas. Dentro da população de células vivas, foi selecionada a população de monócitos, após a população CD14+, onde posteriormente foi avaliado a expressão de PD-1.

3.3. Dosagem de PD-1 e PD-L1 solúvel

Para a determinação de PD1 e PDL1 solúvel foi utilizado o soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2 e de controles saudáveis por ELISA (Duo-set, R&D, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. Análise estatística

Para a análise estatística e representação gráfica dos resultados foi utilizado o programa *Graph Pad Prism 9* (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil (IQR). O teste ANOVA One-way foi utilizado para a análise de variância utilizando o teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis* para comparar

mais de três grupos de dados. Nas análises de correlação foi utilizado o teste de *Pearson*. O nível de significância foi considerado quando $P \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1 Perfil clínico dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2

Foram avaliados 125 pacientes com diagnóstico positivo para a COVID-19 por RT-PCR procedentes das unidades de Enfermaria e UTI do HC-FMUSP. A coorte de estudo foi composta por 70 pacientes com quadro moderado, 16 pacientes com quadro grave e 39 pacientes críticos. Para o grupo controle foram utilizadas amostras de indivíduos não infectados de ambos os sexos com idades pareadas, totalizando 21 controles. Na Tabela 5 estão representados os dados demográficos dos pacientes e representados nas Figuras 6 e 7.

Quanto ao sexo da coorte foi composto: grupo controle com 52% de mulheres e 48% homens. Já os pacientes do grupo moderado, 39% eram mulheres e 61% homens, no grupo grave 37% eram mulheres e 63% homens, já no grupo crítico 46% de mulheres e 54% de homens (Figura 6A). Em relação a idade dos integrantes do estudo, no grupo controle o sexo feminino teve uma média de idade de 45,4 anos e o sexo masculino 47,3. anos. No grupo moderado o sexo feminino apresentou média de 56,6 anos e o sexo masculino de 54,7 anos, no grupo grave ambos os sexos mostraram média de idade de 49,7 anos e no grupo crítico o sexo feminino foi de 59,4 anos e 57 anos para o sexo masculino (Tabela 5). A figura 6B mostra a distribuição de sexo por idade dos participantes do estudo, evidenciando a paridade e homogeneidade das amostras.

Quanto à evolução clínica dos pacientes, no grupo moderado 80% dos pacientes obtiveram alta, 17% foram a óbito e 3% transferidos para outra unidade. No grupo grave 94% dos pacientes obtiveram alta e 6% foram a óbito; e no grupo crítico 45% dos pacientes obtiveram alta, 50% foram a óbito e 6% transferidos para outra unidade (Figura 6C e Tabela 5). Percentualmente a taxa de óbitos foi maior nos pacientes do grupo crítico em relação ao grupo de pacientes moderados e graves.

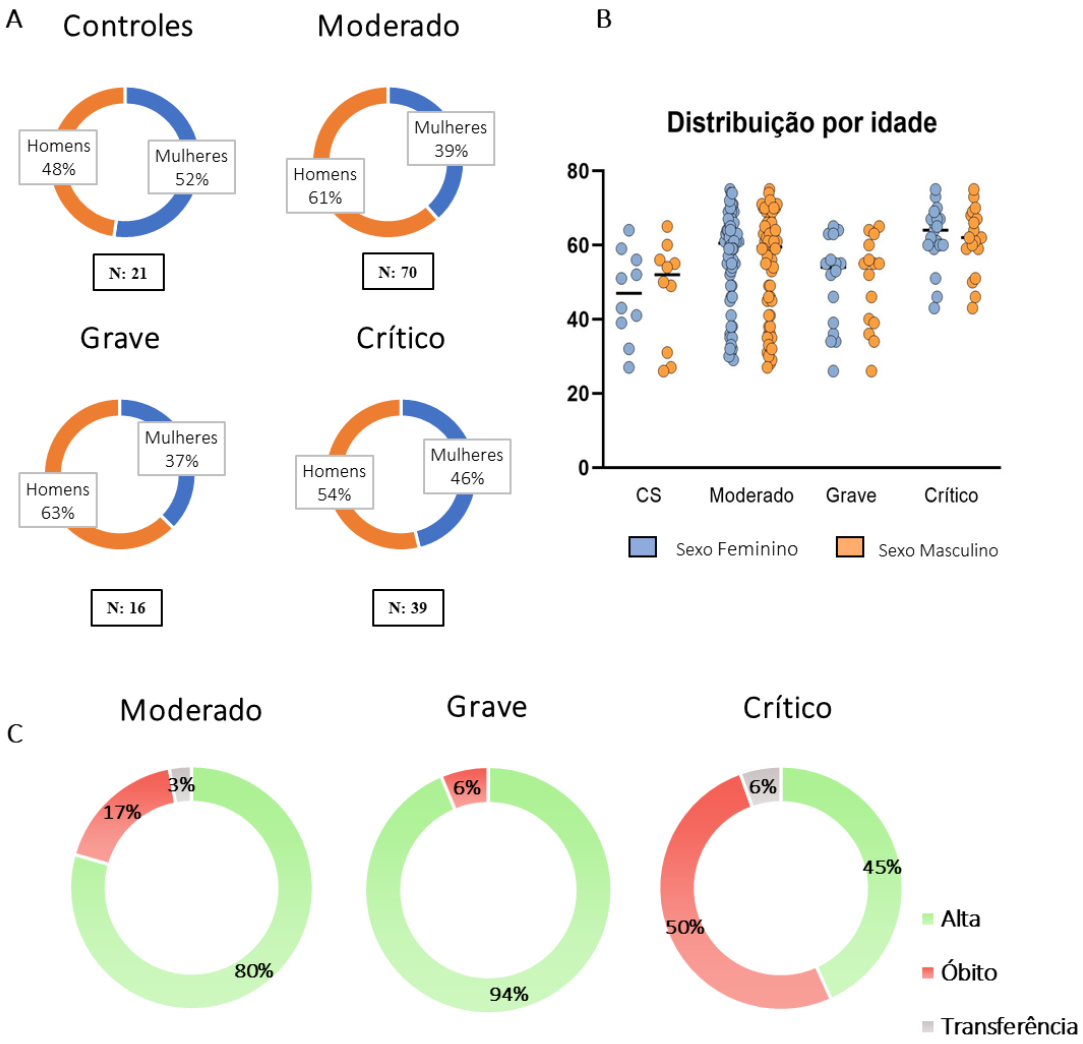

Figura 6.Representação gráfica dos dados demográficos dos pacientes com SARS-CoV-2. Os gráficos mostram as características da coorte: número total de indivíduos de cada um dos grupos, distribuição de idade e sexo e evolução clínica dos pacientes. A) Frequência do sexo entre os grupos. B) Distribuição do sexo e idade entre os grupos. C) Frequência do destino clínico dos pacientes. Legenda: CS – controle saudável, N – número amostral.

As comorbidades na coorte de pacientes estão representadas na Figura 7 e Tabela 5. Hipertensão arterial sistêmica (HAS) e/ou distúrbios cardiovasculares foi a comorbidade de maior prevalência entre os grupos da coorte, correspondendo a 32 (28%) pacientes no grupo moderado, 7 (27%) no grupo grave e 26 (31%) no grupo crítico. O segundo distúrbio mais prevalente foi a diabetes mellitus, acometendo 19 (17%) pacientes moderados, 6 (23%) graves e 15 (18%) críticos. A obesidade estava presente em 8 (7%) pacientes moderados, 3 (11%) graves e 8 (10%) críticos. Coagulopatias foram apresentadas por 1 paciente (1%) moderado e

em 1 (1%) crítico. O uso de álcool/cigarro foi observado em 5 pacientes (4%) do grupo moderado e em 3 (4%) do grupo crítico. Sorologia positiva para o vírus da hepatite B e vírus da hepatite C, foi observada em apenas 1 paciente (1%) do grupo moderado. Distúrbios hepáticos estavam presentes em 3 (3%) pacientes moderados e 2 (2%) críticos. Distúrbios renais foram apresentados por 13 (12%) pacientes do grupo moderado, 3 (8%) graves e 5 (6%) do grupo crítico, sendo a insuficiência renal aguda ou crônica o distúrbio renal mais presente.

Distúrbios neurológicos como ansiedade e depressão também foram observados na coorte por 8 (7%) dos pacientes do grupo moderado e 3 (4%) crítico. Distúrbios respiratórios como asma e bronquite foram apresentados por 3 (3%) pacientes moderados, 1 (1%) grave e 5 (6%) críticos. Distúrbios metabólicos como hipotireoidismo e dislipidemias estiveram presentes em 13 (12%) pacientes do grupo moderado, 1 (4%) grave e 7 (9%) críticos. No caso de doença autoimune foi observada somente em 1 (1%) paciente do grupo moderado com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Em toda a coorte houveram pacientes sem nenhuma comorbidade, sendo 5 (4%) pacientes no grupo moderado, 6 (23%) do grupo grave e 7 (8%) pacientes do grupo crítico.

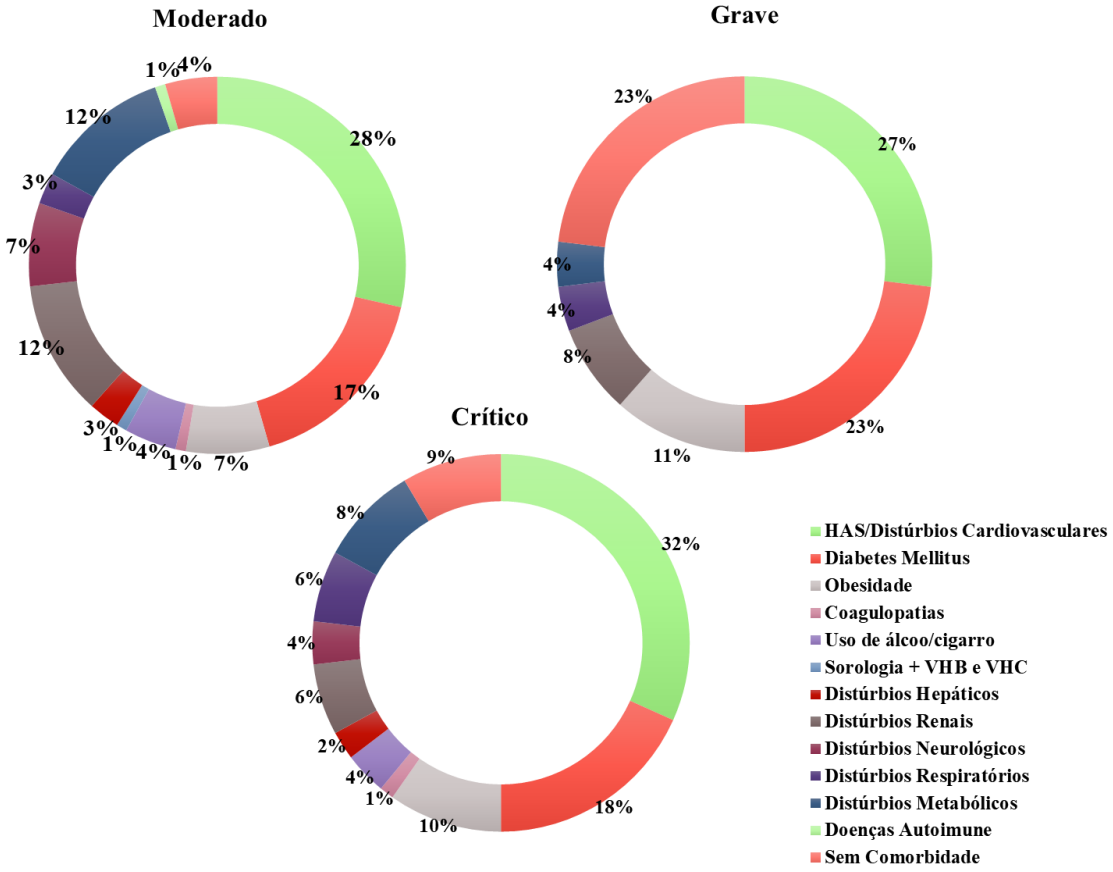

Figura 7.Comorbidades da coorte de pacientes acometidos com a COVID-19.

Os gráficos ilustram a presença de comorbidades; o número de comorbidades combinadas apresentadas em 70 pacientes moderados, 16 graves e 39 críticos. Legenda: HAS – Hipertensão arterial sistêmica. VHB – Vírus da Hepatite B. VHC – Vírus da Hepatite C.

Tabela 5. Dados demográficos dos pacientes acometidos com SARS-CoV-2

	CS (N=21)		Moderado (N=70)		Grave (N=16)		Crítico (N=39)	
Sexo Feminino/Sexo Masculino	11/10		27/43		6/10		18/21	
	Média		Média		Média		Média	
Idade (geral)	46,42		55,67		49,74		50,13	
Idade (F)	45,4		56,6		49,7		59,4	
Idade (M)	47,3		54,7		49,7		57	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Evolução								
Alta	·	·	56	80	15	94	18	46
Óbito	·	·	12	17	1	6	19	49
Transferência	·	·	2	3	0	0	2	5
Comorbidades								
HAS/Distúrbios Cardiovasculares	·	·	32	28	7	27	26	31
Diabetes Mellitus	·	·	19	17	6	23	15	18
Obesidade	·	·	8	7	3	11	8	10
Coagulopatias	·	·	1	1	0	0	1	1
Uso de álcool/cigarro	·	·	5	1	0	0	3	4
Sorologia + VHB VHC	·	·	1	1	0	0	0	0
Abuso de medicamentos	·	·	0	0	0	0	1	1
Distúrbios Hepáticos	·	·	3	3	0	0	2	2
Distúrbios Renais	·	·	13	12	2	8	5	6
Distúrbios Neurológicos	·	·	8	7	0	0	3	4
Distúrbios Respiratórios	·	·	3	3	1	4	5	6
Distúrbios Metabólicos	·	·	13	12	1	4	7	9
Doença Autoimune	·	·	1	1	0	0	0	0
Sem Comorbidade	·	·	5	4	6	23	7	8

Dados de idade, evolução e comorbidades dos indivíduos controles e dos pacientes acometidos com a COVID-19 classificados como moderado, grave e crítico. Legenda: M – masculino; F – feminino; CS – controle saudável, N – número amostral; HAS – hipertensão arterial sistêmica.

4.2 Análise fenotípica de linfócitos totais na COVID-19

Em indivíduos acometidos pela COVID-19 foi observado diminuição dos linfócitos, levando à linfopenia, de acordo com a gravidade. Primeiramente, a análise foi realizada com o valor absoluto de linfócitos totais (Figura 8A) procedente do hemograma dos pacientes e controles. Em seguida foi realizada a análise fenotípica dos linfócitos totais (Figura 8B) do sangue periférico dos pacientes e controles por citometria de fluxo.

A figura 8A evidencia a linfopenia nos pacientes grave/críticos em relação aos indivíduos controles, pelos dados do hemograma. Já a análise fenotípica de linfócitos por citometria de fluxo (Figura 8B) mostra uma diminuição da frequência de linfócitos em pacientes moderados e graves/críticos em relação aos indivíduos controles.

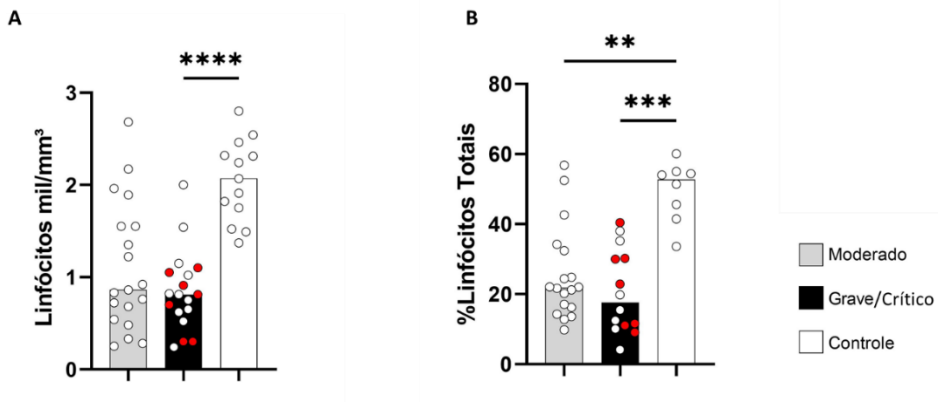

Figura 8.Diminuição da frequência de linfócitos totais nos pacientes com estado clínico moderado e grave/crítico na infecção por SARS-CoV-2. Os gráficos mostram o valor absoluto de linfócitos totais em hemograma (A) - grupo moderado (n=19), grave/críticos (11/6) e controle (n=13) - e a frequência de linfócitos totais dentro de células vivas (B) - grupo moderado (n=18), grave/críticos (7/7) e controle (n=8) no sangue periférico dos pacientes e controles saudáveis. **P<0.01, ***P<0,001 e ****P<0.0001**.** Observação: na barra de pacientes "grave/crítico" os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.3 Análise fenotípica de populações de linfócitos TCD4+ e TCD8+

A linfopenia dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, pode conduzir a uma resposta inflamatória desequilibrada em associação com a tempestade de citocinas que favorecem ao quadro de exaustão dos linfócitos. Para avaliar o fenótipo de exaustão nos pacientes analisamos

a expressão de PD-1 (proteína 1 de morte celular programada) marcador de exaustão de células T, responsável por limitar sua atividade em respostas inflamatórias a infecções (Quezada, S., Peggs, K, 2013). Para avaliar a frequência de células T de memória utilizamos o marcador CD45RO (Hu, G., Wang, S., 2017).

Também avaliamos a frequência de PD-L1 (ligante da proteína 1 de morte celular programada) em células TCD4+ e TCD8+, mas não foi observada expressão deste marcador (dados não mostrados).

Na Figura 9 podemos observar que a frequência de células TCD4+ não apresentou alteração entre os grupos e controles (Figura 9A), mas há aumento da frequência de células TCD4+ CD45RO+ já nos pacientes moderados que se acentuam nos graves/críticos em relação ao controle (Figura 9B). Contudo, o aumento percentual de células TCD4+CD45RO+PD-1+ (Figura 8C) e células TCD4+PD-1+ (Figura 9D) foi observado apenas em pacientes graves/críticos em relação aos indivíduos controles.

O aumento da expressão de células T CD4+ CD45RO+PD-1+ pode ser um fator associado à gravidade da infecção.

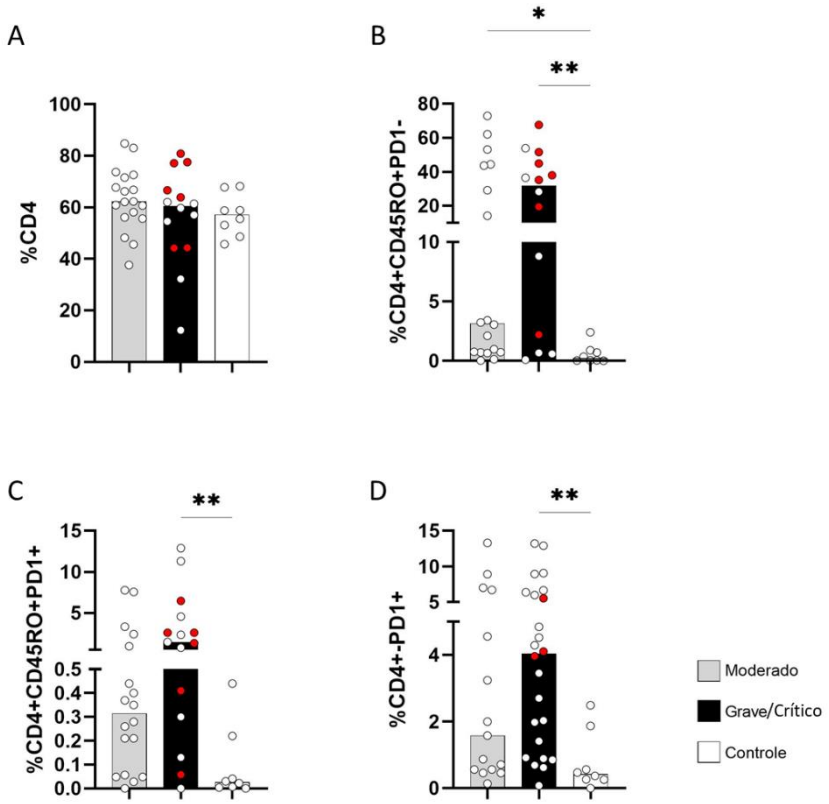

Figura 9.Aumento da frequência da expressão de PD1 e CD45RO em linfócitos T CD4+ em indivíduos com a COVID-19. Os gráficos estão representados a frequência da expressão de (A) linfócitos TCD4+; (B) CD45RO+PD1- em linfócitos T CD4+, (C) CD45RO+PD1+ em

linfócitos TCD4+, (D) PD1+ em linfócitos TCD4+, em indivíduos controles (n=8) e pacientes em estado clínico moderado (n=18) e grave/crítico (n=7/7). *P<0.05, **P<0.01. Observação: na barra de pacientes “grave/crítico” os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

Também avaliamos a frequência e análise fenotípica de células TCD8+ dentro de linfócitos totais nos pacientes infectados (Figura 10A) e a frequência de células CD45RO+PD-1- (Figura 10B), CD45RO+PD-1+ (Figura 10C), e PD-1+ (Figura 10D) dentro de células TCD8+. Não foi observada diferença de frequência na população de linfócitos TCD8+ e da expressão de PD1 entre os grupos, o que sugere que a frequência de células TCD8+ está mais preservada na COVID-19.

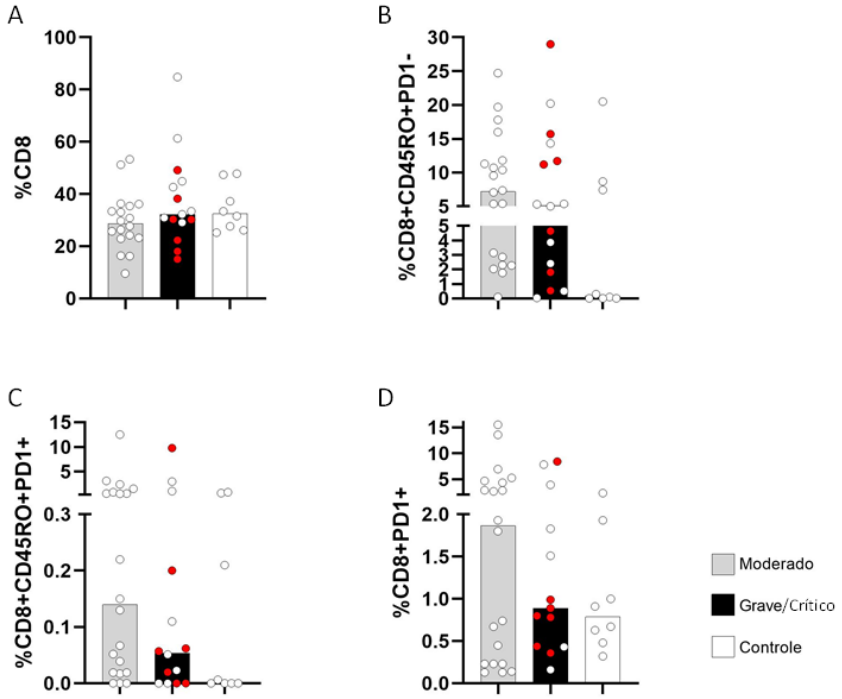

Figura 10.Frequência da expressão de PD-1 e CD45RO em linfócitos T CD8+ em indivíduos com a COVID-19. Nos gráficos estão representados a frequência da expressão de (A) linfócitos TCD8+; (B) CD45RO+PD1- em linfócitos T CD8+, (C) CD45RO+PD1+ em linfócitos TCD8+, (D) PD1+ em linfócitos TCD8+, em indivíduos controles (n=8) e pacientes em estado clínico moderado (n=18) e grave/crítico (n=7/7). Observação: na barra de pacientes “grave/crítico” os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.4 Análise fenotípica de populações de linfócitos B

A frequência de células B foi similar entre os grupos analisados (Figura 11A), porém pode-se notar aumento da frequência de células CD19+PD-1+ já na condição moderada e também grave/crítica da doença em relação aos indivíduos controles (Figura 11B), A frequência de PD-L1 em células CD19+, não se alterou entre os grupos (dados não mostrados).

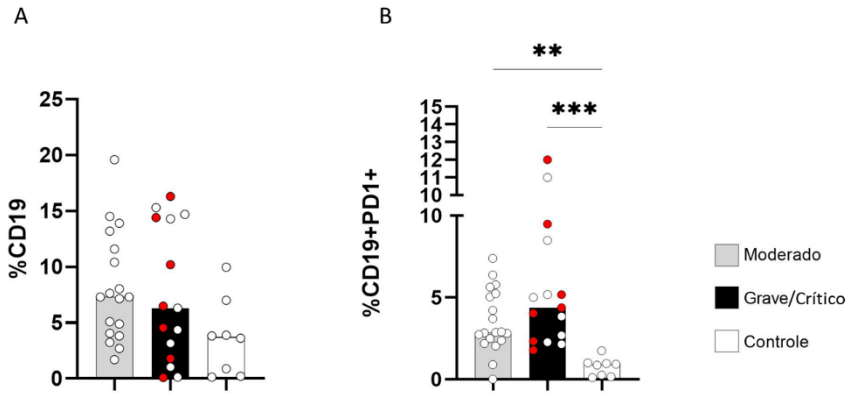

Figura 11.Aumento da frequência da expressão de marcadores de exaustão em linfócitos B em indivíduos com a COVID-19. Nos gráficos estão representados a frequência da expressão de (A) linfócitos CD19+; (B) PD1+ em linfócitos CD19+ em indivíduos controles (n=8) e pacientes em estado clínico moderado (n=18) e grave/crítico (n=7/7). **P<0.01, ***P<0,001. Observação: na barra de pacientes "grave/crítico" os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.5 Avaliação fenotípica de Monócitos CD14+

A expressão de CD14 em monócitos provém um perfil pró-inflamatório por ser caracterizado como um correceptor de TLRs e também como um PRR, desempenhado importante papel na resposta imune inata (Kapellos TS et. al, 2019). Assim, avaliamos a frequência de monócitos totais (Figura 12A) e a expressão de PD1+ em monócitos CD14+, classificados como monócitos clássicos por citometria de fluxo (Figura 12B) nas amostras dos pacientes com COVID19. Também avaliamos PD-L1 em células CD14+, mas não foi observada expressão significativa deste marcador (dados não mostrados).

Há uma queda na frequência de monócitos totais observado nos pacientes moderados em relação aos indivíduos controles (Figura 12A). Houve aumento da frequência de monócitos CD14+PD1+ nos pacientes graves/críticos em relação aos indivíduos controles (Figura 12B).

Há uma frequência similar entre os pacientes críticos e graves, mas sugere que a regulação positiva de PD-1 em monócitos está presente desde a condição moderada da doença.

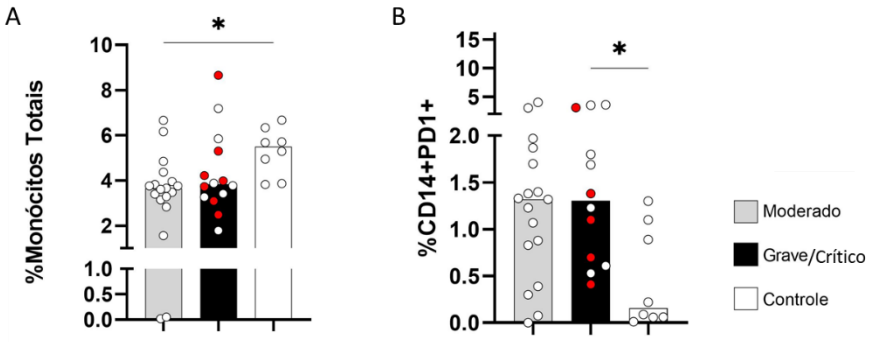

Figura 12. Aumento da frequência da expressão de marcadores de exaustão em monócitos em indivíduos com a COVID-19. Nos gráficos estão representados a frequência da expressão de (A) monócitos CD14+; (B) PD1+ em monócitos CD14 em indivíduos controles (n=8) e pacientes em estado clínico moderado (n=18) e grave/crítico (n=7/7). * P<0.05. Observação: na barra de pacientes "grave/crítico" os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.6 Análise fenotípica de linfócitos TCD4+, TCD8+ CD19+ e Monócitos CD14+ em pacientes com a COVID-19 em relação ao tempo de infecção

Avaliamos nas populações de células PD1+, quanto ao tempo de infecção, ou seja, a análise dos pacientes com PCR+ para COVID-19 na primeira semana (1-7 dias do PCR), ou com mais de 8 dias (8 a 20 dias de PCR+). O aumento da frequência de monócitos PD-1+ nos pacientes graves/críticos foram identificados a partir do 8º dia de infecção, sugerindo estar correlacionado com o tempo de infecção (Figura 13M). Já quanto aos linfócitos TCD4+, TCD8+ e CD19+ não houve alteração de expressão de PD-1 de acordo com o tempo de infecção.

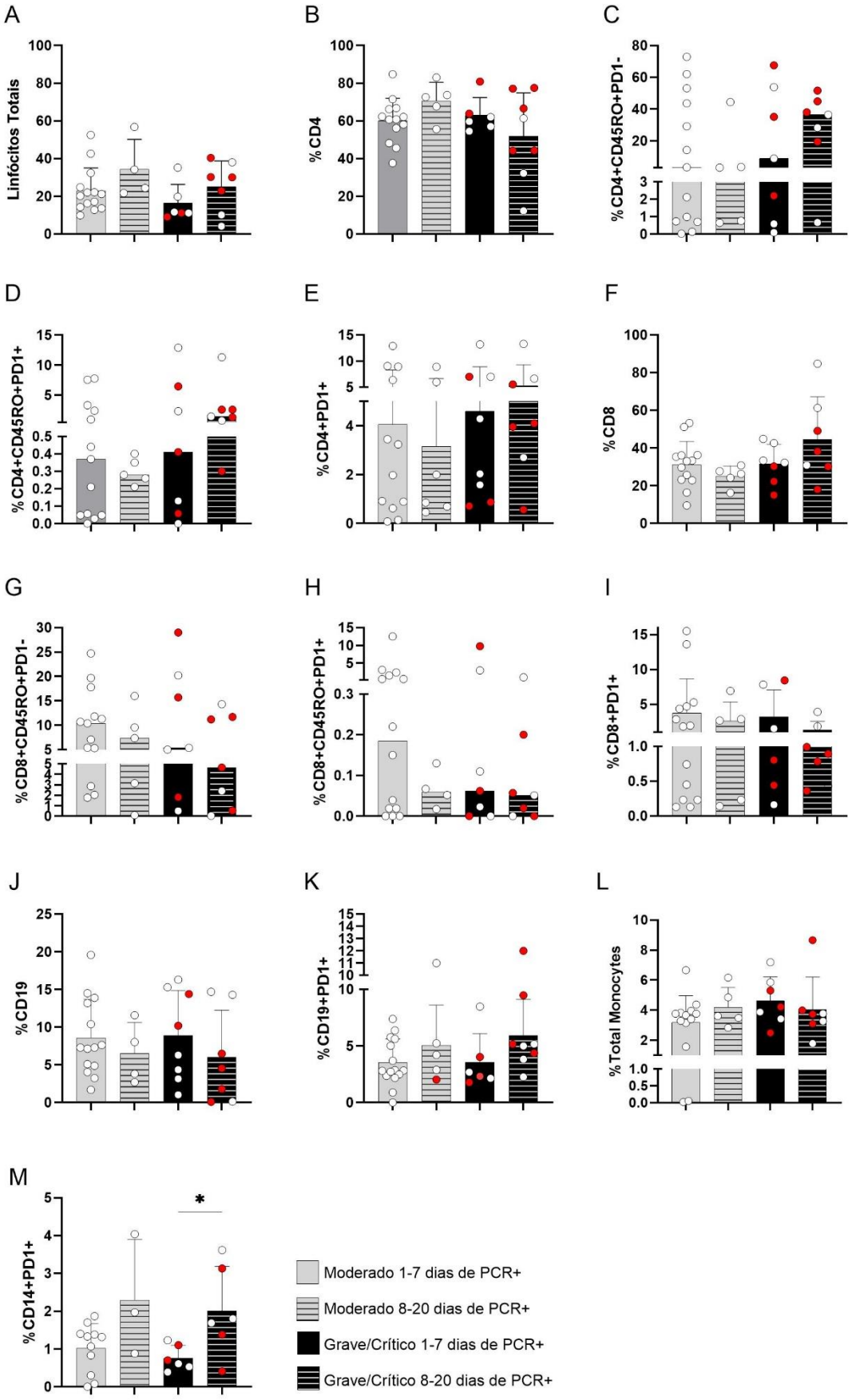
A
Linfócitos Totais
B
% CD4
C
% CD4+CD45RO+PD1-
D
% CD4+CD45RO+PD1+
E
% CD4+PD1+
F
% CD8
G
% CD8+CD45RO+PD1-
H
% CD8+CD45RO+PD1+
I
% CD8+PD1+
J
% CD19
K
% CD19+PD1+
L
% Total Monocytes
M
% CD14+PD1+
*
Moderado 1-7 dias de PCR+
Moderado 8-20 dias de PCR+
Grave/Crítico 1-7 dias de PCR+
Grave/Crítico 8-20 dias de PCR+

Figura 13. Frequência da expressão de marcadores de memória e exaustão em linfócitos TCD4+, TCD8+ e CD19+ no período de 1-7 dias e 8-20 dias de PCR+ em indivíduos com COVID-19. Nos gráficos estão representados a frequência da expressão de (A) linfócitos totais dentro de células vivas; (B) frequência da expressão de linfócitos TCD4+; (C) PD1+ em linfócitos TCD4+, ; (D) CD45RO+PD1- em linfócitos T CD4+, (E) CD45RO+PD1+ em linfócitos TCD4+; (F) linfócitos TCD8+; (G) PD1+ em linfócitos T CD8+, (H) CD45RO+PD1+ em linfócitos TCD8+, (I) CD45+PD1- em linfócitos TCD8+, (J) linfócitos CD19+; (K) PD1+ em linfócitos CD19+; (L) monócitos totais em células vivas; (M) PD1+ em monócitos CD14+ e (N) PD1- em monócitos CD14+ em indivíduos controles (n=8) e pacientes em estado clínico moderado (n=18) e grave/crítico (n=7/7).* $P<0.05$. Observação: na barra de pacientes "grave/crítico" os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.7 Avaliação dos níveis séricos de PD-1 e PD-L1 solúveis

Os níveis de sPD-1 e sPD-L1 foram avaliados no soro de 69 pacientes moderados, 43 pacientes graves/críticos e 15 indivíduos controles. O PD-L1 é o ligante de proteína 1 de morte celular programada e em conjunto com PD-1 funciona como um mecanismo regulador negativo de células como linfócitos T e B inibindo sua proliferação e produção de citocinas, também afeta o metabolismo e ações efetoras de células dendríticas, macrófagos, monócitos e etc. A porção solúvel de PD-L1 (sPDL1) se dá pela clivagem da fração extracelular de PD-L1 por enzimas metaloproteinases da matriz. Os níveis séricos de PD-1 e PD-L1 mostram efeitos regulatórios opostos, sendo que sPD-1 interage com PD-L1 promovendo a ativação de células T, já o sPD-L1 se liga ao receptor PD-1 na superfície de células T inibindo sua ativação e proliferação (Yanhua Li et al. 2015).

Níveis similares de sPD-1 foram detectados entre os grupos analisados (Figura 14A). Já quanto ao sPD-L1 houve aumento dos níveis nos pacientes graves/críticos em relação aos controles saudáveis (Figura 14B). Estes dados corroboram com o perfil de exaustão evidenciado pelos linfócitos da coorte de pacientes infectados, e indicam que o aumento de níveis de sPD-L1 pode ser uma tentativa de regulação da expressão de PD-1, na gravidade dos pacientes.

Não houve diferença na análise dos níveis séricos de PD-1 e PD-L1 de acordo com o tempo de infecção de 1 a 7 dias e de 8 a 25 dias.

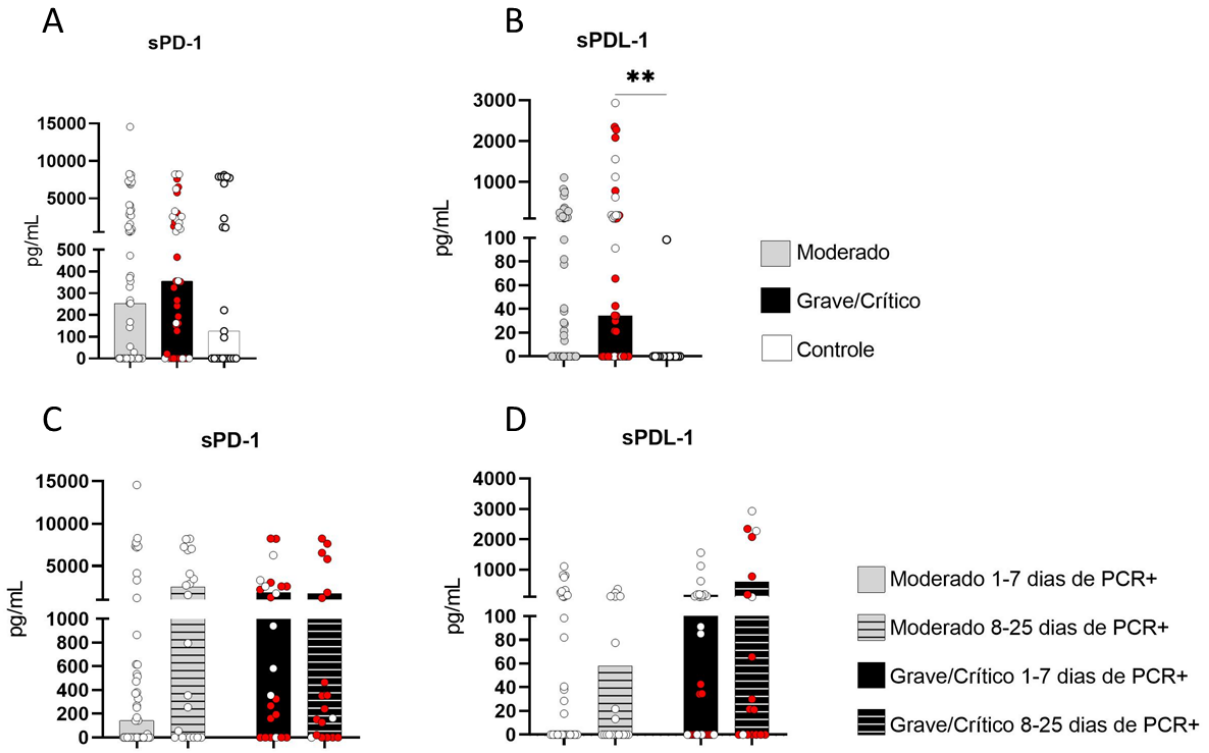

Figura 14. Aumento dos níveis de PDL-1 no soro de pacientes graves/críticos infectados por SARS-CoV-2. Nos gráficos estão representados (A) os níveis séricos de PD-1 e (B) PDL-1 em indivíduos controles (n=15) e pacientes moderados (n=69) e graves/críticos (n=43) com COVID-19; (C) os níveis séricos de PD-1 e (D) PDL-1 em pacientes moderados e graves/críticos no período de 1-7 dias e 8-25 dias de PCR+ para SARS-CoV-2. **P<0.01. Observação: na barra de pacientes "grave/crítico" os ícones em branco indicam os pacientes graves e os vermelhos os pacientes críticos.

4.8 Análise da correlação de sPD-L1 com marcadores laboratoriais associados a gravidade na infecção por SARS-CoV-2

Devido a importância do eixo PD-1/PDL-1 na evolução da infecção de pacientes acometidos pela COVID-19 avaliamos a correlação dos níveis séricos de PDL-1 com indicadores laboratoriais relacionados à gravidade da doença dos pacientes, tais como: PCR (proteína C reativa) (Figura 15A), D-dímero (Figura 15B), neutrófilos (Figura 15C), linfócitos (Figura 15D), relação neutrófilos/linfócitos (Figura 15E) e plaquetas (Figura 15F). Não foi observada correlação entre os componentes analisados, indicando que o aumento dos títulos de sPD-L1 no soro de pacientes com COVID-19 não está associado a esses marcadores.

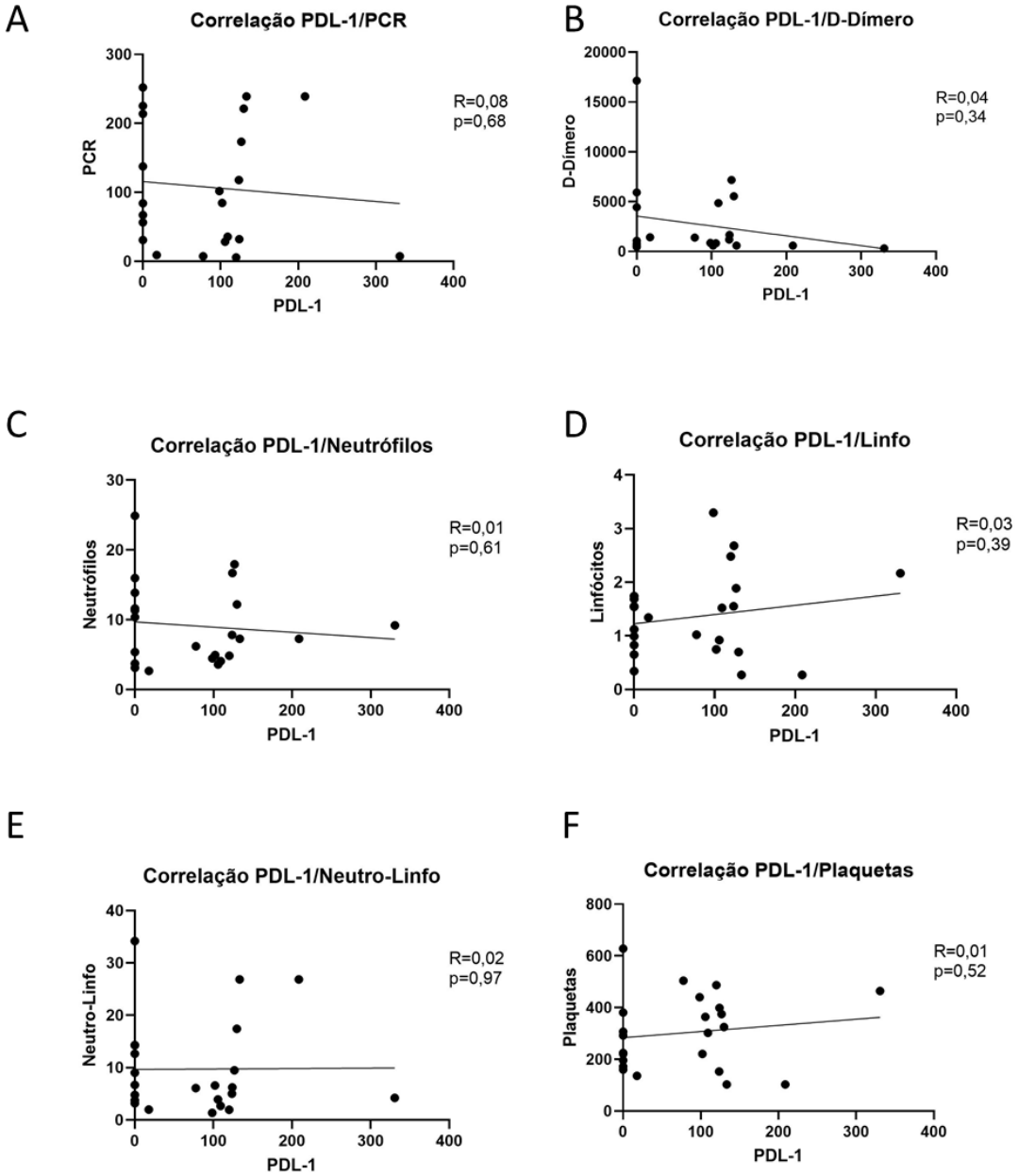

Figura 15. Ausência de correlação entre títulos séricos de sPDL-1 e de indicadores de gravidade em pacientes com a COVID-19. Correlação entre os níveis séricos de sPDL-1 em indivíduos acometidos por SARS-CoV-2 e indicadores de gravidade em exames laboratoriais de (A) PCR, (B) D-Dímero; (C) neutrófilos; (D) Linfócitos; (E) neutrófilos e linfócitos e (F) plaquetas em pacientes moderados e graves/críticos.

5. Discussão

O conhecimento acerca da patogênese da infecção por SARS-CoV-2 permanece com lacunas a serem estudadas. Os linfócitos desempenham importante papel na resposta imune na eliminação do vírus e proteção de longo prazo contra novas infecções. Entretanto, mecanismos utilizados pelo SARS-CoV-2 já se mostraram capazes de prejudicar essa resposta causando a exaustão dessas células, levando a um quadro de linfopenia e com relação com a gravidade da doença. O eixo PD-1/PD-L1, importante molécula de checkpoint inibitório da resposta imune, se mostrou relevante na evolução e gravidade na COVID-19.

A coorte de pacientes infectados por SARS-CoV-2 provenientes do Hospital das Clinicas-FMUSP, foi classificada em grupos de pacientes denominados moderados, graves e críticos de acordo com as diretrizes "Therapeutic Trial Synopsis" da Organização Mundial da Saúde. Nos grupos estudados, a progressão da infecção por SARS-CoV-2 foi maior em pacientes do sexo masculino do que em pacientes do sexo feminino. Estudos sugerem que a maior expressão de ACE2 em homens do que em mulheres, fatores imunológicos baseados no sexo impulsionados pelo hormônio sexual e pelo cromossomo X e hábitos sociais estão relacionados com a maior prevalência, gravidade e mortalidade pela COVID-19 em homens (Zhao, Yu, et al. 2020; Gemmati et al. 2020; Shim, Eunha, et al. 2020). Em relação ao desfecho clínico, foi observada maior taxa de óbitos em pacientes críticos, com taxa de 50%. Nos pacientes moderados a taxa de óbitos foi de 17% e em pacientes graves 6%.

As comorbidades mais frequentes dos pacientes em estudo foram hipertensão arterial sistêmica, distúrbios cardiovasculares, diabetes mellitus e obesidade, respectivamente. É descrito que pacientes graves da COVID-19 possuem maior prevalência de hipertensão (Gold, Morgan Spencer, et al. 2020). Em boletim epidemiológico é observado maior incidência de óbitos (83%) no Brasil em pacientes que apresentam comorbidades, sendo doenças cardíacas crônicas (35%) e diabetes (28,7%) as de maior prevalência (Pachiega et al. 2020). Estudos também evidenciaram o aumento da expressão de ACE2 em pacientes com obesidade e diabetes, o que corrobora para maior suscetibilidade à infecção pelo SARS-Cov-2 e agravamento da COVID-19 (Jia et al., 2020). Outro estudo indicou a relação positiva entre o IMC (índice de massa corpórea) e a expressão de ACE2 (Emilsson, Valur, et al. 2021), além disso, um estudo de meta-analise mostrou que a obesidade estava relacionada a um risco aumentado de ventilação mecânica durante a admissão na UTI (unidade de terapia intensiva) (Zhou, Yue, et al., 2020). Ademais, comorbidades crônicas são caracterizadas por um estado

pró-inflamatório constante e disfunção da imunidade inata e adaptativa, (Brownlee et al., 2001; Hameed et al., 2015). Em conjunto, esses dados podem ajudar na compreensão da relação entre comorbidades e gravidade da infecção por SARS-CoV-2.

Evidenciamos linfopenia em pacientes graves e críticos e redução da frequência de linfócitos totais em todos os grupos de pacientes, mais intenso nos pacientes graves e críticos. Foi demonstrado que cerca de 85% dos pacientes graves da COVID-19 sofrem de linfopenia, sendo uma característica comum na infecção por SARS-CoV-2, fator associado com a gravidade e mortalidade (Huang et al., 2020; Yang et al., 2020).

Diversos fatores podem contribuir para um quadro de linfopenia, dentre eles a exaustão dos linfócitos. Em infecções virais os antígenos são apresentados às células TCD4+ virgens que são ativadas e passam a produzir TNF-α, IL-2 e IFN-γ, promovendo a diferenciação dos CTLs (linfócitos T citotóxicos) que agem na eliminação de células infectadas, contudo, a estimulação contínua de células T pode levar a exaustão (Bengsch, Martin et al., 2014).

O PD-1 (proteína de morte programada 1) é um importante marcador de exaustão de linfócitos. A expressão de PD-1 na superfície de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e interação com seu ligante PD-L1 (ligante de proteína de morte programada 1) leva a regulação negativa do sistema imune, suprimindo a atividade inflamatória das células T, levando-as à apoptose. Na análise de células TCD4+ observamos aumento da expressão de PD-1 em pacientes graves e críticos. Estudos mostram hiper expressão de PD-1 em células T durante o progresso dos estágios sintomáticos da COVID-19 (Diao et al., 2020), o que contribui para evolução da forma grave da doença (H.-Y. Zheng et al., 2020). Além disso, o eixo PD-1/PD-L1 pode inibir a secreção de IFN-γ pelas células TCD4+ prejudicando a resposta imune antiviral (Keir M.E. 2008).

Na análise de células TCD8+ não observamos diferença quanto expressão de PD-1 nos pacientes infectados. Há relatos de aumento de expressão de receptores inibitórios como PD-1 em células TCD8+ em pacientes COVID-19 (De Biasi et al., 2020; Canção e outros, 2020; Zheng et al., 2020a; Zheng et al., 2020b). Contudo, um estudo demonstrou que células TCD8+ que expressam PD-1 não mostrou disfuncionalidade na fase aguda da doença, sugerindo que a expressão de PD-1 nessas células está relacionada à sua ativação, e não na exaustão na COVID-19 (Rha, Min-Seok, et al., 2021). Além disso, dados acerca do aumento e/ou redução da atividade citotóxica de linfócitos TCD8+ na infecção por SARS-CoV-2 também foram descritos (ZHENG et al., 2020; AHMADI et al., 2020), o que indica diferentes resultados quanto a funcionalidade das células TCD8+ na COVID-19.

Em linfócitos B observamos expressão de PD-1 em todos os grupos de pacientes, contudo, maior expressão nos pacientes graves e críticos. Estudos demonstraram que células B podem regular as respostas imunes através da via PD-1/PD-L1 (Gallego-Valle et al., 2018; Khan et al., 2015; Siewe et al., 2013; Xiao et al., 2016). O aumento de PD-1 pode inibir a proliferação de células B e a produção de citocinas por meio do BCR (receptor de células B) (Okazaki T. et al. 2001). Outro estudo demonstrou que células B exaustas podem suprimir a proliferação e viabilidade de células TCD4+ e TCD8+, o que pode diminuir a capacidade de eliminar patógenos (Wang, Xufu, et al, 2019). Além disso, podem suprimir respostas de anticorpos específicos dependentes de células TCD4+ (Haro MA et al., 2016). Na infecção por SARS-CoV-2 a resposta humoral está correlacionada com o desfecho da doença, onde a resposta eficaz de anticorpos e células T está associada à resolução bem-sucedida de pacientes moderados da COVID-19 (Grifoni et al., 2020), logo o perfil de exaustão das células B pode ser indicativo de gravidade na infecção por SARS-CoV-2.

Na análise da frequência de células T de memória observamos aumento células TCD4+ CD45RO+ em pacientes moderados graves e críticos, sendo que as células TCD4+CD45RO+ PD-1+ foram evidenciadas nos pacientes graves e críticos. Não houve diferença na expressão de CD45RO em células TCD8. A expressão de CD45RO indica ativação e memória em células T (Hu, G., Wang, S., 2017). A presença de PD-1 em células TCD45RO+ foi relacionada com o processo de redução da expressão de células T de memória (Bardhan, Kankana, et al. 2019). Esses achados sugerem o papel de PD-1 em células de memória, podendo prejudicar a geração de resposta imune de longa duração na COVID-19.

Na avaliação de monócitos totais houve menor frequência em pacientes moderados, entretanto, ao avaliar monócitos clássicos, caracterizados pela expressão de CD14, o aumento de PD-1 foi evidenciado somente em pacientes graves e críticos, estando relacionado com maior tempo de infecção e maior MFI (dados não mostrados). Os monócitos são células imunes inatas fagocitárias circulantes e sob condições patológicas, como infecções virais, são ativados e recrutados por mediadores inflamatórios, infiltram tecidos afetados onde se diferenciam em macrófagos inflamatórios e fenótipos semelhantes a DCs (células dendríticas) para cumprir suas funções efetoras de atividades pró e anti-inflamatórias, apresentação de antígenos e remodelação tecidual (Guilliams M et al., 2018). A expressão de PD-1 em monócitos CD14+ foi associada a supressão de células TCD8+ em pacientes com carcinoma hepatocelular (Yun, J., Yu, G., Hu, P. et al, 2020) e a indução da secreção de IL-10, levando à inibição da atividade das células TCD4+ em pacientes com HIV (Said, Elias A., et al., 2010). Níveis elevados de IL-10 em pacientes COVID-19 podem estar relacionados ao eixo PD-1/PD-L1 no desenvolvimento

de infecções virais agudas e rearranjo de monócitos (Parackova, Zuzana, et al., 2020). Além disso, o esgotamento de monócitos em pacientes moderados e graves foi associado a maior frequência de células T de memória efetoras que expressam o marcador de exaustão PD-1 na COVID-19 (Padgett, Lindsey E., et al., 2020), o que sugere importante papel dos monócitos no curso da resposta imune adaptativa ao SARS-CoV-2.

Ao analisar o eixo PD-1/PD-L1 no soro de pacientes infectados, foi observado aumento de sPD-L1 nos pacientes graves e críticos. Níveis séricos de sPD-1 e sPD-L1 são marcadores imuno-reguladores importantes descritos em diversas patologias. Doenças inflamatórias como pancreatite aguda (AP) apresentam níveis elevados de sPD-L1(Pan, T et al. 2017). Em pacientes com artrite reumatoide (AR) foi observado aumento de sPD-1 no soro e líquido sinovial estando relacionado a títulos de fator reumatoide e o escore de atividade da doença (Liu, C et al., 2015). Em pacientes com hepatite C crônica o aumento de sPD-L1 foi relacionado a progressão e gravidade da doença (Yamagiwa, S et al., 2017). Em pacientes HIV níveis elevados de sPD-L1 também foram observados, considerados como possíveis indicativos de prognóstico no tratamento (Avendaño-Ortiz et al., 2020). Além disso, níveis aumentados de sPD-L1 podem induzir efeitos supressores em células T ativadas através da ligação ao receptor PD-1 na superfície dessas células, inibindo sua proliferação e produção de IFN-γ (Yanhua Li et al. 2015). A hiper expressão de sPD-L1 também foi observada no soro de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (FPI) (Geng, Y et al., 2019), patologia relacionada a maior risco de COVID-19 grave (Taz, T.A et al. 2021). Ademais, níveis elevados da porção sérica de PD-L1, TIM-3 e MMP-7 foram indicados como biomarcadores promissores para diferenciar pacientes com COVID-19 que requerem ventilação mecânica invasiva (Chavez-Galan, Leslie, et al., 2022). Outro estudo demonstrou que os níveis de sPD-L1 mostra um papel prognóstico em pacientes com COVID-19, onde o aumento está associado à patogênese da COVID-19 (Sabbatino, Francesco, et al. 2021).

Apesar de não observarmos correlação de sPD-L1 com marcadores laboratoriais associados a gravidade na COVID-19 como PCR, relação de neutrófilos/linfócitos, plaquetas e d-dímero, nossos achados indicam potencial papel do eixo PD-1/PD-L1 na gravidade da COVID-19, podendo ser um biomarcador de interesse na infecção por SARS-CoV-2.

6. Conclusão

Em conjunto, este estudo destaca o papel potencial do eixo PD-1/PD-L1 na COVID-19 e sugere sPD-L1 com um possível marcador de gravidade na infecção pelo SARS-CoV-2. O fenótipo exausto de monócitos, linfócitos B e TCD4+ pode estar relacionado a evolução e gravidade da infecção. Mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento da via PD-1/PD-L1 no curso da doença COVID-19.

7. Referências Bibliográficas

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 181-192, 10 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9.

V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. Coronavirus biology and replication: implications for sars-cov-2. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 155-170, 28 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6.

SUN, Pengfei; LU, Xiaosheng; XU, Chao; SUN, Wenjuan; PAN, Bo. Understanding of COVID-19 based on current evidence. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 548-551, 5 mar. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25722.

SEAH, Ivan; SU, Xinyi; LINGAM, Gopal. Revisiting the dangers of the coronavirus in the ophthalmology practice. **Eye**, [S.L.], v. 34, n. 7, p. 1155-1157, 6 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41433-020-0790-7.

CHAN, Jasper Fuk-Woo; KOK, Kin-Hang; ZHU, Zheng; CHU, Hin; TO, Kelvin Kai-Wang; YUAN, Shuofeng; YUEN, Kwok-Yung. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 221-236, 1 jan. 2020. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902.

WANG, Mei-Yue; ZHAO, Rong; GAO, Li-Juan; GAO, Xue-Fei; WANG, De-Ping; CAO, Ji-Min. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. Frontiers In Cellular And Infection Microbiology, [S.L.], v. 10, n. 10, p. 10-20, 25 nov. 2020. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269.

Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions, WHO, 2020.
THEVARAJAN, Irani; NGUYEN, Thi H. O.; KOUTSAKOS, Marios; DRUCE, Julian; CALY, Leon; SANDT, Carolien E. van de; JIA, Xiaoxiao; NICHOLSON, Suellen; CATTON, Mike; COWIE, Benjamin. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe covid-19. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 453-455, 16 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2.

LONG, Quan-Xin; LIU, Bai-Zhong; DENG, Hai-Jun; WU, Gui-Cheng; DENG, Kun; CHEN, Yao-Kai; LIAO, Pu; QIU, Jing-Fu; LIN, Yong; CAI, Xue-Fei. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. Nature Medicine, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 845-848, 29 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1.

PIERCE, Carl A.; PRESTON-HURLBURT, Paula; DAI, Yile; ASCHNER, Clare Burn; CHESHENKO, Natalia; GALEN, Benjamin; GARFORTH, Scott J.; HERRERA, Natalia G.; JANGRA, Rohit K.; MORANO, Nicholas C.. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. Science Translational Medicine, [S.L.], v. 12, n. 564, p. 10-19, 21 set. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5487.

AMANNA, Ian J.; CARLSON, Nichole E.; SLIFKA, Mark K.. Duration of Humoral Immunity to Common Viral and Vaccine Antigens. New England Journal Of Medicine, [S.L.], v. 357, n. 19, p. 1903-1915, 8 nov. 2007. Massachusetts Medical Society. http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa066092.

CROTTY, Shane; FELGNER, Phil; DAVIES, Huw; GLIDEWELL, John; VILLARREAL, Luis; AHMED, Rafi. Cutting Edge: long-term b cell memory in humans after smallpox vaccination. The Journal Of Immunology, [S.L.], v. 171, n. 10, p. 4969-4973, 7 nov. 2003. The American Association of Immunologists. http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.4969.

NGUYEN-CONTANT, Phuong; EMBONG, A. Karim; KANAGAIAH, Preshetha; CHAVES, Francisco A.; YANG, Hongmei; BRANCHE, Angela R.; TOPHAM, David J.; SANGSTER, Mark Y.. S Protein-Reactive IgG and Memory B Cell Production after Human SARS-CoV-2 Infection Includes Broad Reactivity to the S2 Subunit. Mbio, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 1-13, 25 set. 2020. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01991-20.

RODDA, Lauren B.; NETLAND, Jason; SHEHATA, Laila; PRUNER, Kurt B.; MORAWSKI, Peter A.; THOUVENEL, Christopher D.; TAKEHARA, Kennidy K.; EGGENBERGER, Julie; HEMANN, Emily A.; WATERMAN, Hayley R.. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. Cell, [S.L.], v. 184, n. 1, p. 169-183, jan. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.029.

SOKAL, Aurélien; CHAPPERT, Pascal; BARBA-SPAETH, Giovanna; ROESER, Anais; FOURATI, Slim; AZZAOUI, Imane; VANDENBERGHE, Alexis; FERNANDEZ, Ignacio; MEOLA, Annalisa; BOUVIER-ALIAS, Magali. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. Cell, [S.L.], v. 184, n. 5, p. 1201-1213, mar. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.050.

KANEKO, Naoki; KUO, Hsiao-Hsuan; BOUCAU, Julie; FARMER, Jocelyn R.; ALLARD-CHAMARD, Hugues; MAHAJAN, Vinay S.; PIECHOCKA-TROCHA, Alicja; LEFTERI, Kristina; OSBORN, Matthew; BALS, Julia. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. Cell, [S.L.], v. 183, n. 1, p. 143-157, out. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.025.

WOODRUFF, Matthew C.; RAMONELL, Richard P.; NGUYEN, Doan C.; CASHMAN, Kevin S.; SAINI, Ankur Singh; HADDAD, Natalie S.; LEY, Ariel M.; KYU, Shuya;

HOWELL, J. Christina; OZTURK, Tugba. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. Nature Immunology, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 1506-1516, 7 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z.

LI, Shiqin; LI, Sijia; DISOMA, Cyrollah; ZHENG, Rong; ZHOU, Mei; RAZZAQ, Aroona; LIU, Pinjia; ZHOU, Yuzheng; DONG, Zijun; DU, Ashuai. SARS-CoV-2: mechanism of infection and emerging technologies for future prospects. Reviews In Medical Virology, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 1-15, 16 set. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2168.

BAHL, Amit; VAN BAALEN, Morgan Nees; ORTIZ, Laura; CHEN, Nai-Wei; TODD, Courtney; MILAD, Merit; YANG, Alex; TANG, Jonathan; NYGREN, Madalyn; QU, Lihua. Early predictors of in-hospital mortality in patients with COVID-19 in a large American cohort. Internal And Emergency Medicine, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 1485-1499, 24 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1007/s11739-020-02509-7.
CHEN, I-Yin; MORIYAMA, Miyu; CHANG, Ming-Fu; ICHINOHE, Takeshi. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. Frontiers In Microbiology, [S.L.], v. 10, p. 1-12, 29 jan. 2019. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00050.

REN, Yujie; SHU, Ting; WU, Di; MU, Jingfang; WANG, Chong; HUANG, Muhan; HAN, Yang; ZHANG, Xue-Yi; ZHOU, Wei; QIU, Yang. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. Cellular & Molecular Immunology, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 881-883, 18 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0485-9.

ZHANG, Bicheng; ZHOU, Xiaoyang; QIU, Yanru; FENG, Fan; FENG, Jia; JIA, Yifan; ZHU, Hengcheng; HU, Ke; LIU, Jiasheng; LIU, Zaiming. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. **Medrxiv**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1-8, 27 fev. 2020. Cold Spring Harbor Laboratory. http://dx.doi.org/10.1101/2020.02.26.20028191.

LI, Jin-Yan; LIAO, Ce-Heng; WANG, Qiong; TAN, Yong-Jun; LUO, Rui; QIU, Ye; GE, Xing-Yi. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. Virus Research, [S.L.], v. 286, p. 198074, set. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074.

Brewer, R.C., Robinson, W.H. & Lanz, T.V. SARS-CoV-2 infection of monocytes: balancing acts of antibodies and inflammasomes. *Sig Transduct Target Ther* **7,** 250 (2022). https://doi.org/10.1038/s41392-022-01112-w

Silvin, Aymeric, et al. “Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19”. Cell, vol. 182, no 6, setembro de 2020, p. 1401-1418.e18. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.002.

Kvedaraite, Egle, et al. “Major Alterations in the Mononuclear Phagocyte Landscape Associated with COVID-19 Severity”. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 118, no 6, fevereiro de 2021, p. e2018587118. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1073/pnas.2018587118.
AMOR, S.; BLANCO, L. Fernández; BAKER, D.. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. Clinical & Experimental Immunology, [S.L.], v. 202, n. 2, p. 193-209, 12 out. 2020. Wiley. http://dx.doi.org/10.1111/cei.13523.

PENG, Yanchun; MENTZER, Alexander J.; LIU, Guihai; YAO, Xuan; YIN, Zixi; DONG, Danning; DEJNIRATTISAI, Wanwisa; ROSTRON, Timothy; SUPASA, Piyada. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. Nature Immunology, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1336-1345, 4 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6.

MODERBACHER, Carolyn Rydyznski; RAMIREZ, Sydney I.; DAN, Jennifer M.; GRIFONI, Alba; HASTIE, Kathryn M.; WEISKOPF, Daniela; BELANGER, Simon; ABBOTT, Robert K.; KIM, Christina; CHOI, Jinyong. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. Cell, [S.L.], v. 183, n. 4, p. 996-1012, nov. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038.

GRIFONI, Alba; WEISKOPF, Daniela; RAMIREZ, Sydney I.; MATEUS, Jose; DAN, Jennifer M.; MODERBACHER, Carolyn Rydyznski; RAWLINGS, Stephen A.; SUTHERLAND, Aaron; PREMKUMAR, Lakshmanane; JADI, Ramesh S.. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. Cell, [S.L.], v. 181, n. 7, p. 1489-1501, jun. 2020. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015.

WEISKOPF, Daniela; SCHMITZ, Katharina S.; RAADSEN, Matthijs P.; GRIFONI, Alba; OKBA, Nisreen M.A.; ENDEMAN, Henrik; AKKER, Johannes P.C. van Den; MOLENKAMP, Richard; KOOPMANS, Marion P.G.; VAN GORP, Eric C.M.. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. Science Immunology, [S.L.], v. 5, n. 48, p. 2071-2080, 26 jun. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071.

TAN, Anthony T.; LINSTER, Martin; TAN, Chee Wah; BERT, Nina Le; CHIA, Wan Ni; KUNASEGARAN, Kamini; ZHUANG, Yan; THAM, Christine Y. L.; CHIA, Adeline; SMITH, Gavin J.. Early induction of SARS-CoV-2 specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. Biorxiv, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 11-22, 16 out. 2020. Cold Spring Harbor Laboratory. http://dx.doi.org/10.1101/2020.10.15.341958.

BRAUN, Julian; LOYAL, Lucie; FRENTSCH, Marco; WENDISCH, Daniel; GEORG, Philipp; KURTH, Florian; HIPPENSTIEL, Stefan; DINGELDEY, Manuela; KRUSE, Beate; FAUCHERE, Florent. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. Nature, [S.L.], v. 587, n. 7833, p. 270-274, 29 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Cell, [S.L.], v. 184, n. 4, p. 861-880, fev. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007.

THEVARAJAN, Irani; NGUYEN, Thi H. O.; KOUTSAKOS, Marios; DRUCE, Julian; CALY, Leon; SANDT, Carolien E. van de; JIA, Xiaoxiao; NICHOLSON, Suellen; CATTON, Mike; COWIE, Benjamin. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe covid-19. Nature Medicine, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 453-455, 16 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2.

BROUWER, Philip J. M.; CANIELS, Tom G.; STRATEN, Karlijn van Der; SNITSELAAR, Jonne L.; ALDON, Yoann; BANGARU, Sandhya; TORRES, Jonathan L.; OKBA, Nisreen M. A.; CLAIREAUX, Mathieu; KERSTER, Gius. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. Science, [S.L.], v. 369, n. 6504, p. 643-650, 15 jun. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.abc5902.

ROBBIANI, Davide F.; GAEBLER, Christian; MUECKSCH, Frauke; LORENZI, Julio C. C.; WANG, Zijun; CHO, Alice; AGUDELO, Marianna; BARNES, Christopher O.; GAZUMYAN, Anna; FINKIN, Shlomo. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. Nature, [S.L.], v. 584, n. 7821, p. 437-442, 18 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9.

MOON, Chang. Fighting COVID-19 exhausts T cells. Nature Reviews Immunology, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 277-277, 6 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0304-7.

FISCHER, Karin; HOFFMANN, Petra; VOELKL, Simon; MEIDENBAUER, Norbert; AMMER, Julia; EDINGER, Matthias; GOTTFRIED, Eva; SCHWARZ, Sabine; ROTHE, Gregor; HOVES, Sabine. Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. Blood, [S.L.], v. 109, n. 9, p. 3812-3819, 25 jan. 2007. American Society of Hematology. http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-07-035972.

Ahmadzadeh, Mojgan, et al. “Tumor Antigen–Specific CD8 T Cells Infiltrating the Tumor Express High Levels of PD-1 and Are Functionally Impaired”. Blood, vol. 114, no 8, agosto de 2009, p. 1537–44. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-195792.

Qorraj, M., et al. “The PD-1/PD-L1 Axis Contributes to Immune Metabolic Dysfunctions of Monocytes in Chronic Lymphocytic Leukemia”. Leukemia, vol. 31, no 2, fevereiro de 2017, p. 470–78. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1038/leu.2016.214.

Yun, Jin, et al. “PD-1 Expression Is Elevated in Monocytes from Hepatocellular Carcinoma Patients and Contributes to CD8 T Cell Suppression”. Immunologic Research, vol. 68, no 6, dezembro de 2020, p. 436–44. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1007/s12026-020-09155-3.

SAKUISHI, Kaori; APETOH, Lionel; SULLIVAN, Jenna M.; BLAZAR, Bruce R.; KUCHROO, Vijay K.; ANDERSON, Ana C.. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. Journal Of Experimental Medicine, [S.L.], v. 207, n. 10, p. 2187-2194, 6 set. 2010. Rockefeller University Press. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20100643.

DAY, Cheryl L.; KAUFMANN, Daniel E.; KIEPIELA, Photini; BROWN, Julia A.; MOODLEY, Eshia S.; REDDY, Sharon; MACKEY, Elizabeth W.; MILLER, Joseph D.; LESLIE, Alasdair J.; DEPIERRES, Chantal. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature, [S.L.], v. 443, n. 7109, p. 350-354, 20 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nature05115.

URBANI S., AMADEI B., TOLA D., MASSARI M., SCHIVAZAPPA S., MISSALE G., FERRARI C. 2006. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. J. Virol. 80:11398–11403. https://doi.org/10.1128/JVI.01177-06

BOETTLER, Tobias; PANTHER, Elisabeth; BENGSCH, Bertram; NAZAROVA, Natalja; SPANGENBERG, Hans Christian; BLUM, Hubert E.; THIMME, Robert. Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8+ T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. Journal Of Virology, [S.L.], v. 80, n. 7, p. 3532-3540, 1 abr. 2006. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/jvi.80.7.3532-3540.2006.

PARRY, Richard V.; CHEMNITZ, Jens M.; FRAUWIRTH, Kenneth A.; LANFRANCO, Anthony R.; BRAUNSTEIN, Inbal; KOBAYASHI, Sumire V.; LINSLEY, Peter S.; THOMPSON, Craig B.; RILEY, James L.. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. Molecular And Cellular Biology, [S.L.], v. 25, n. 21, p. 9543-9553, 1 nov. 2005. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/mcb.25.21.9543-9553.2005.

WANG, Xufu; WANG, Guoqiang; WANG, Zenghua; LIU, Bin; HAN, Na; LI, Jiao; LU, Chenghui; LIU, Xinfeng; ZHANG, Qin; YANG, Qingbo. PD-1-expressing B cells suppress CD4+ and CD8+ T cells via PD-1/PD-L1-dependent pathway. Molecular Immunology, [S.L.], v. 109, p. 20-26, maio 2019. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.009.

HUI, Enfu; CHEUNG, Jeanne; ZHU, Jing; SU, Xiaolei; TAYLOR, Marcus J.; WALLWEBER, Heidi A.; SASMAL, Dibyendu K.; HUANG, Jun; KIM, Jeong M.; MELLMAN, Ira. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. Science, [S.L.], v. 355, n. 6332, p. 1428-1433, 9 mar. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf1292.

JONES, R. Brad; NDHLOVU, Lishomwa C.; BARBOUR, Jason D.; SHETH, Prameet M.; JHA, Aashish R.; LONG, Brian R.; WONG, Jessica C.; SATKUNARAJAH, Malathy; SCHWENEKER, Marc; CHAPMAN, Joan M.. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. Journal Of Experimental Medicine, [S.L.], v. 205, n. 12, p. 2763-2779, 10 nov. 2008. Rockefeller University Press. http://dx.doi.org/10.1084/jem.20081398.

MONNEY, Laurent; SABATOS, Catherine A.; GAGLIA, Jason L.; RYU, Akemi; WALDNER, Hanspeter; CHERNOVA, Tatyana; MANNING, Stephen; GREENFIELD, Edward A.; COYLE, Anthony J.; SOBEL, Raymond A.. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature, [S.L.], v. 415, n. 6871, p. 536-541, jan. 2002. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/415536a.

GOLDEN-MASON, Lucy; PALMER, Brent E.; KASSAM, Nasim; TOWNSHEND-BULSON, Lisa; LIVINGSTON, Stephen; MCMAHON, Brian J.; CASTELBLANCO, Nicole; KUCHROO, Vijay; GRETCH, David R.; ROSEN, Hugo R.. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. Journal Of Virology, [S.L.], v. 83, n. 18, p. 9122-9130, 8 jul. 2009. American Society for Microbiology. http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00639-09.

DIAO, Bo; WANG, Chenhui; TAN, Yingjun; CHEN, Xiewan; LIU, Ying; NING, Lifen; CHEN, Li; LI, Min; LIU, Yueping; WANG, Gang. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Frontiers In Immunology, [S.L.], v. 11, p. 1-15, 1 maio 2020. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827.

BOBCAKOVA, Anna; PETRISKOVA, Jela; VYSEHRADSKY, Robert; KOCAN, Ivan; KAPUSTOVA, Lenka; BARNOVA, Martina; DIAMANT, Zuzana; JESENAK, Milos. Immune Profile in Patients With COVID-19: lymphocytes exhaustion markers in relationship to clinical outcome. Frontiers In Cellular And Infection Microbiology, [S.L.], v. 11, p. 1-17, 15 abr. 2021. Frontiers Media SA. http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.646688.

PENG, Weiyi; LIU, Chengwen; XU, Chunyu; LOU, Yanyan; CHEN, Jieqing; YANG, Yan; YAGITA, Hideo; OVERWIJK, Willem W.; LIZÉE, Gregory; RADVANYI, Laszlo. PD-1 Blockade Enhances T-cell Migration to Tumors by Elevating IFN-γ Inducible Chemokines. Cancer Research, [S.L.], v. 72, n. 20, p. 5209-5218, 20 ago. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-1187.

DURAISWAMY, Jaikumar; KALUZA, Karen M.; FREEMAN, Gordon J.; COUKOS, George. Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T-Cell Rejection Function in Tumors. Cancer Research, [S.L.], v. 73, n. 12, p. 3591-3603, 30 abr. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-12-4100.

DAY, Cheryl L.; KAUFMANN, Daniel E.; KIEPIELA, Photini; BROWN, Julia A.; MOODLEY, Eshia S.; REDDY, Sharon; MACKEY, Elizabeth W.; MILLER, Joseph D.; LESLIE, Alasdair J.; DEPIERRES, Chantal. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature, [S.L.], v. 443, n. 7109, p. 350-354, 20 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nature05115.

TRAUTMANN, Lydie; JANBAZIAN, Loury; CHOMONT, Nicolas; A SAID, Elias; GIMMIG, Sylvain; BESSETTE, Benoit; BOULASSEL, Mohamed-Rachid; DELWART, Eric; SEPULVEDA, Homero; BALDERAS, Robert s. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. Nature Medicine, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1198-1202, 20 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. http://dx.doi.org/10.1038/nm1482.

GOLDEN-MASON L, PALMER B, KLARQUIST J, MENGSHOL JA, CASTELBLANCO N, ROSEN HR. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. J Immunol January 1, 2013, 190 (1) 211-219. doi.org/10.4049/jimmunol.1201108

Therapeutic Trial Synopsis, WHO 2020

Quezada, S., Peggs, K. Explorando CTLA-4, PD-1 e PD-L1 para reativar a resposta imune do hospedeiro contra o câncer. *Br J Câncer* **108,** 1560-1565 (2013). https://doi.org/10.1038/bjc.2013.117

Hu, G., Wang, S. Tumor-infiltrando CD45RO + Memória T Linfócitos Predizem Resultados Clínicos Favoráveis em Tumores Sólidos. Representante Científico 7, 10376 (2017). https://doi.org/10.1038/s41598-017-11122-2

Gallego-Valle, J., Pérez-Fernández, V.A., Correa-Rocha, R., Pion, M., 2018. Generation of human breg-like phenotype with regulatory function in vitro with bacteria-derived oligodeoxynucleotides. Int. J. Mol. Sci. 19. https://doi.org/10.3390/ijms19061737. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu. Rev. Immunol. 26, 677–704. https://doi.org/10.1146/ annurev.immunol.26.021607.090331

Khan, A.R., Hams, E., Floudas, A., Sparwasser, T., Weaver, C.T., Fallon, P.G., 2015. PDL1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. Nat. Commun. 6, 5997. https://doi.org/10.1038/ncomms6997.

Siewe, B., Stapleton, J.T., Martinson, J., Keshavarzian, A., Kazmi, N., Demarais, P.M., French, A.L., Landay, A., 2013. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8+ T cell function in vitro. J. Leukoc. Biol. 93, 811–818. https://doi.org/10.1189/jlb.0912436.

Xiao, X., Lao, X.-M., Chen, M.-M., Liu, R.-X., Wei, Y., Ouyang, F.-Z., Chen, D.-P., Zhao, X.-Y., Zhao, Q., Li, X.-F., Liu, C.-L., Zheng, L., Kuang, D.-M., 2016. PD-1hi identifies a novel regulatory B-cell population in human hepatoma that promotes disease progression. Cancer Discov. 6, 546–559. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-

Xufu Wang, Guoqiang Wang, Zenghua Wang, Bin Liu, Na Han, Jiao Li, Chenghui Lu, Xinfeng Liu, Qin Zhang, Qingbo Yang, Guoming Wang, 2019. PD-1- expressing B cells suppress CD4+ and CD8+ T cells via PD-1/PD-L1- dependent pathway. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.009

Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. Front Immunol. 2019;10:2035. Published 2019 Aug 30. doi:10.3389/fimmu.2019.02035

Yanhua Li, Yunfeng Xiao, Mingquan Su, Rong Zhang, Jianbing Ding, Xiaoke Hao, Yueyun Ma. Role of soluble programmed death-1 (sPD-1) and sPD-ligand 1 in patients with cystic echinococcosis, Experimental and Therapeutic Medicine. Published 2015, November 18. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2876

Marcotte, Harold, et al. “Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 Months after Infection”. IScience, vol. 25, no 2, fevereiro de 2022, p. 103743. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103743.

Wang, Pengfei, et al. “Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7”. Nature, vol. 593, no 7857, maio de 2021, p. 130–35. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2.

Ciabattini, Annalisa, et al. “Evidence of SARS-CoV-2-Specific Memory B Cells Six Months After Vaccination With the BNT162b2 mRNA Vaccine”. Frontiers in Immunology, vol. 12, 2021. Frontiers, https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.740708.

Wang, P., Nair, M.S., Liu, L. et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. Nature 593, 130–135 (2021). https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2

HOU, Hongyan; ZHANG, Yandi; TANG, Guoxing; LUO, Ying; LIU, Wei; CHENG, Chang; JIANG, Yuhuan; XIONG, Zhigang; WU, Shiji; SUN, Ziyong. Immunologic memory to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients at 1 year postinfection. Journal Of Allergy And

Clinical Immunology, [S.L.], v. 148, n. 6, p. 1481-1492, dez. 2021. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2021.09.008.

Abdul Aleem, Abdul Bari Akbar Samad, Amy K. Slenker. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19), 2022. PMID: 34033342

Vacinas - Covid-19, ANVISA, 2022. https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas

Ministério da Saúde, Brasil Pátria Vacinada, 28 de janeiro de 2022. https://www.gov.br/saude/pt-br/vacinacao/

Wu, Zhiwei, et al. "Safety, Tolerability, and Immunogenicity of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine (CoronaVac) in Healthy Adults Aged 60 Years and Older: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1/2 Clinical Trial". The Lancet Infectious Diseases, vol. 21, no 6, junho de 2021, p. 803–12. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30987-7.

Lamb, Yvette N. "BNT162b2 MRNA COVID-19 Vaccine: First Approval". Drugs, vol. 81, no 4, março de 2021, p. 495–501. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1007/s40265-021-01480-7.

Stephenson, Kathryn E., et al. "Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19". JAMA, vol. 325, no 15, abril de 2021, p. 1535. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1001/jama.2021.3645.

Hung, Ivan F. N., e Gregory A. Poland. "Single-Dose Oxford–AstraZeneca COVID-19 Vaccine Followed by a 12-Week Booster". The Lancet, vol. 397, no 10277, março de 2021, p. 854–55. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00528-6.

Hung, Ivan F. N., e Gregory A. Poland. "Single-Dose Oxford–AstraZeneca COVID-19 Vaccine Followed by a 12-Week Booster". The Lancet, vol. 397, no 10277, março de 2021, p. 854–55. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00528-6.

Pala, Laura, et al. "Course of Sars-CoV2 Infection in Patients with Cancer Treated with Anti-PD-1: A Case Presentation and Review of the Literature". Cancer Investigation, vol. 39, no 1, janeiro de 2021, p. 9–14. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1844893.

Loretelli, Cristian, et al. "PD-1 Blockade Counteracts Post–COVID-19 Immune Abnormalities and Stimulates the Anti–SARS-CoV-2 Immune Response". JCI Insight, vol. 6, no 24, dezembro de 2021, p. e146701. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1172/jci.insight.146701.

Zhao, Yu, et al. “Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2”. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, vol. 202, no 5, setembro de 2020, p. 756–59. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1164/rccm.202001-0179LE.

Gemmati, Donato, et al. “COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-Chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males?” International Journal of Molecular Sciences, vol. 21, no 10, maio de 2020, p. 3474. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.3390/ijms21103474.

Shim, Eunha, et al. “Transmission Potential and Severity of COVID-19 in South Korea”. International Journal of Infectious Diseases, vol. 93, abril de 2020, p. 339–44. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.031.

Gold, Morgan Spencer, et al. “COVID-19 and comorbidities: a systematic review and meta-analysis”. Postgraduate Medicine, vol. 132, no 8, novembro de 2020, p. 749–55. Taylor and Francis+NEJM, https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1786964.

Pachiega, Julianne, et al. “Chronic heart diseases as the most prevalent comorbidities among deaths by COVID-19 in Brazil”. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, vol. 62, 2020, p. e45. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062045.

Jia X., Yin C., Lu S., Chen Y., Liu Q., Bai J. Preprints; 2020. Two Things about COVID-19 Might Need Attention. 2020020315.

Emilsson, Valur, et al. “Serum Levels of ACE2 Are Higher in Patients with Obesity and Diabetes”. Obesity Science & Practice, vol. 7, no 2, abril de 2021, p. 239–43. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1002/osp4.472.

Zhou, Yue, et al. “Comorbidities and the Risk of Severe or Fatal Outcomes Associated with Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-Analysis”. International Journal of Infectious Diseases, vol. 99, outubro de 2020, p. 47–56. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.029.

Brownlee, Michael. “Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications”. Nature, vol. 414, no 6865, dezembro de 2001, p. 813–20. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1038/414813a.

Hameed, Iqra, et al. “Type 2 Diabetes Mellitus: From a Metabolic Disorder to an Inflammatory Condition”. World Journal of Diabetes, vol. 6, no 4, 2015, p. 598. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i4.598.

Huang, Chaolin, et al. “Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China”. The Lancet, vol. 395, no 10223, fevereiro de 2020, p. 497–506. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

Yang, Xiaobo, et al. “Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients with SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study”. The Lancet Respiratory Medicine, vol. 8, no 5, maio de 2020, p. 475–81. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5.

Bengsch, B. , Martin, B. , & Thimme, R. (2014). Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. Journal of Hepatology, 61(6), 1212–1219. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.005

Diao, B. , Wang, C. , Tan, Y. , Chen, X. , Liu, Y. , Ning, L. , … Chen, Y. (2020). Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019. Frontiers in Immunology, https://doi.org/ 10.3389/fimmu.2020.00827

Keir M.E. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu. Rev. Immunol. 2008;26:677–704. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331

Zheng H.Y. Zhang M. Yang C.X. Zhang N. Wang X.C. Yang X.P. Dong X.Q. Zheng Y.T. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. Cell. Mol. Immunol. 2020; 17: 541-543 https://doi.org//10.1038/s41423-020-0401-3

Zheng M. Gao Y. Wang G. Song G. Liu S. Sun D. Xu Y. Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. Cell. Mol. Immunol. 2020; 17: 533-535 https://doi.org//10.1038/s41423-020-0402-2

Rha, Min-Seok, et al. “PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19”. Immunity, vol. 54, no 1, janeiro de 2021, p. 44-52.e3. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.12.002.

Bardhan, Kankana, et al. “Phosphorylation of PD-1-Y248 Is a Marker of PD-1-Mediated Inhibitory Function in Human T Cells”. Scientific Reports, vol. 9, no 1, dezembro de 2019, p. 17252. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1038/s41598-019-53463-0.

Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, Kurosaki T, Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:13866–71.

Haro MA, Littrell CA, Yin Z, Huang X, Haas KM. PD-1 suppresses development of humoral responses that protect against Tn-bearing tumors. Cancer Immunol Res 2016; 4:1027–37.

Wang, Xufu, et al. “PD-1-Expressing B Cells Suppress CD4+ and CD8+ T Cells via PD-1/PD-L1-Dependent Pathway”. Molecular Immunology, vol. 109, maio de 2019, p. 20–26. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.009.

Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity (2018) 49:595–613. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005

Padgett, Lindsey E., et al. Interplay of Monocytes and T Lymphocytes in COVID-19 Severity. preprint, Immunology, 18 de julho de 2020. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1101/2020.07.17.209304.

Said, Elias A., et al. “Programmed Death-1–Induced Interleukin-10 Production by Monocytes Impairs CD4+ T Cell Activation during HIV Infection”. Nature Medicine, vol. 16, no 4, abril de 2010, p. 452–59. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.1038/nm.2106.

Parackova, Zuzana, et al. “Disharmonic Inflammatory Signatures in COVID-19: Augmented Neutrophils’ but Impaired Monocytes’ and Dendritic Cells’ Responsiveness”. Cells, vol. 9, no 10, setembro de 2020, p. 2206. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.3390/cells9102206.

Yun, J., Yu, G., Hu, P. et al. PD-1 expression is elevated in monocytes from hepatocellular carcinoma patients and contributes to CD8 T cell suppression. Immunol Res 68, 436–444 (2020). https://doi.org/10.1007/s12026-020-09155-3

Pan, T.; Zhou, T.; Li, L.; Liu, Z.; Chen, Y.; Mao, E.; Li, M.; Qu, H.; Liu, J. Monocyte programmed death ligand-1 expression is an early marker for predicting infectious complications in acute pancreatitis. Crit. Care 2017, 21, 186.

Liu, C.; Jiang, J.; Gao, L.; Wang, X.; Hu, X.; Wu, M.; Wu, J.; Xu, T.; Shi, Q.; Zhang, X. Soluble PD-1 aggravates progression of collagen-induced arthritis through Th1 and Th17 pathways. Arthritis Res. Ther. 2015, 17, 340

Yamagiwa, S.; Ishikawa, T.; Waguri, N.; Sugitani, S.; Kamimura, K.; Tsuchiya, A.; Takamura, M.; Kawai, H.; Terai, S. Increase of soluble programmed cell death ligand 1 in patients with chronic hepatitis, C. Int. J. Med. Sci. 2017, 14, 403–411.

Avendaño-Ortiz, J.; Rubio-Garrido, M.; Lozano-Rodríguez, R.; Del Romero, J.; Rodríguez, C.; Moreno, S.; Aguirre, L.A.; Holguín, Á.; López-Collazo, E. Soluble PD-L1: A potential immune marker for HIV-1 infection and virological failure. Medicine 2020, 99, e20065.

Geng, Y.; Liu, X.; Liang, J.; Habiel, D.M.; Kulur, V.; Coelho, A.L.; Deng, N.; Xie, T.; Wang, Y.; Liu, N.; et al. PD-L1 on invasive fibroblasts drives fibrosis in a humanized model of idiopathic pulmonary fibrosis. JCI Insight 2019, 4, e125326.

Taz, T.A.; Ahmed, K.; Paul, B.K.; Kawsar, M.; Aktar, N.; Mahmud, S.M.H.; Moni, M.A. Network-based identification genetic effect of SARS-CoV-2 infections to Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients. Brief Bioinform. 2021, 22, 1254–1266.

Chavez-Galan, Leslie, et al. "Circulating Levels of PD-L1, TIM-3 and MMP-7 Are Promising Biomarkers to Differentiate COVID-19 Patients That Require Invasive Mechanical Ventilation". Biomolecules, vol. 12, no 3, março de 2022, p. 445. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.3390/biom12030445.

Sabbatino, Francesco, et al. "PD-L1 Dysregulation in COVID-19 Patients". Frontiers in Immunology, vol. 12, junho de 2021, p. 695242. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.695242.

8. Anexos

Produção científica

Beserra, Danielle Rosa; Alberca, Ricardo Wesley; Branco, Anna Claudia Calvielli Castelo; Oliveira, Luana Mendonça; De Souza Andrade, Milena Mary; Gozzi-Silva, Sarah Cristina; Teixeira, Franciane Mouradian Emidio; Yendo, Tatiana Mina; Da Silva Duarte, Alberto José; Sato, Maria Notomi. *Upregulation Of PD-1 expression and high sPD-L1 levels associated with COVID-19 Severity*. Journal Of Immunology Research, V. 2022, P. 1-9, 2022.

Alberca, Ricardo Wesley; Teixeira, Franciane Mouradian Emidio; **Beserra, Danielle Rosa**; De Oliveira, Emily Araujo; Andrade, Milena Mary De Souza; Pietrobon, Anna Julia; Sato, Maria Notomi. Perspective: *The potential effects of Naringenin in COVID-19. Frontiers In Immunology*, V. 11, P. 10-16, 2020.

Alberca, Ricardo Wesley; Andrade, Milena Mary De Souza; Branco, Anna Cláudia Calvielli Castelo; Pietrobon, Anna Julia; Pereira, Nátalli Zanete; Fernandes, Iara Grigoletto; Oliveira, Luana De Mendonça; Teixeira, Franciane Mouradian Emidio; **Beserra, Danielle Rosa**; De Oliveira, Emily Araujo; Gozzi-Silva, Sarah Cristina; Ramos, Yasmim Álefe Leuzzi; De Brito, Cyro Alves; Arnone, Marcelo; Orfali, Raquel Leao; Aoki, Valeria; Duarte, Alberto Jose Da Silva; Sato, Maria Notomi. *Frequencies of CD33+CD11B+HLA-DR-CD14-CD66B+ and CD33+CD11B+HLA-DR-CD14+CD66B- cells in peripheral blood as severity immune biomarkers in COVID-19*. Frontiers In Medicine, V. 7, P. 1-5, 2020.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias
Pesquisador principal – Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

Departamento/Instituto - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP

Convite à participação – Convidamos o(a) Sr.(a) para participar desta pesquisa, que tem como objetivo estudar e entender melhor a infecção por COVID-19, como controle saudável, sem infecção pelo COVID-19.

Justificativa e objetivos do estudo - O surto em curso do COVID-19 representa uma grande ameaça à saúde pública e vem causando uma mortalidade devastadora. A caracterização de marcadores imunológicos da doença, pode oferecer, através de seus resultados, futuras perspectivas para novos tratamentos terapêuticos, e contribuição ao entendimento e enfrentamento da infecção por COVID-19.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – O participante selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Serão coletados exames de sangue, sem nenhum custo para o participante. O participante pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – Será coletada amostra de sangue de uma veia. A picada da agulha da coleta, pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Durante a coleta de sangue, pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele.

Benefícios esperados para o participante – O indivíduo que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre a infecção por COVID-19 ou simplesmente descobrirmos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Se houver a necessidade de mais algum exame, o indivíduo que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá toda a informação e assistência

que precisar. Todos os participantes terão acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento.

O indivíduo não é obrigado a realizar estes exames específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo quem não concordar em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo. A qualquer momento, o indivíduo tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

Garantia de que o participante receberá uma via do termo de consentimento – O participante receberá uma via do termo de consentimento rubricada pelo pesquisador.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - Caso aconteça algo que prejudique a sua saúde e que esteja relacionado com sua participação no estudo, é garantido pela lei brasileira que você receba indenização de acordo com o dano ou prejuízo causado durante a pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3°. andar, IMT II CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3061-7499/7194. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID-19". Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. Dr Alberto José da Silva Duarte) ou pessoa (s) por ele delegada (s) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

---------- Data____/____/_____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pacientes COVID-19

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias
Pesquisador principal - Prof Dr Alberto José da Silva Duarte

Departamento/Instituto - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP

Convite à participação – Convidamos o(a) Sr.(a) para participar desta pesquisa, que tem como objetivo estudar e entender melhor a infecção por COVID-19

Justificativa e objetivos do estudo - O surto em curso do COVID-19 representa uma grande ameaça à saúde pública e vem causando uma mortalidade devastadora. A caracterização de marcadores imunológicos da doença, e oferecer, através de seus resultados, futuras perspectivas para novos tratamentos terapêuticos, e contribuição ao entendimento e enfrenta*mento* da infecção por COVID-19.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – O paciente selecionado para participar do estudo deverá concordar com a sua participação. Serão coletados exames de sangue sem nenhum custo para o paciente, que pode aproveitar o dia das consultas para colher os exames. O paciente pode em qualquer momento não concordar em fazer os exames que serão pedidos.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – Será coletada amostra de sangue de uma veia. A picada da agulha da coleta, pode levar a um leve desconforto que passará em poucos minutos. Durante a coleta de sangue, pode haver uma dor mínima, parecida com uma picada de formiga, e pode ficar uma mancha roxa no local que desaparece em poucos dias. Algumas pessoas podem às vezes sentir tonturas ou até desmaio após a coleta de sangue, e mais raramente pode haver infecção no local que entrou a agulha na pele.

Benefícios esperados para o participante – O paciente que participar do estudo poderá beneficiar-se ou não do estudo. Pode ser que sejam obtidas respostas para algumas dúvidas que existem sobre a infecção por COVID-19 ou simplesmente descobrirmos algum dado novo que possa contribuir com futuras pesquisas sobre este assunto.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Os pacientes continuarão a ser acompanhados como sempre no HCFMUSP. Se houver a necessidade de mais algum exame, o paciente que concordar com o estudo poderá ser ainda convocado via telefone ou carta para vir a uma consulta, mesmo antes do seu retorno e terá toda a informação e assistência que precisar. Todos os pacientes terão

acesso aos resultados de seus exames no momento em que quiserem e com as explicações necessárias para seu entendimento. O paciente não é obrigado a realizar estes exames específicos se não quiser, o que não implica que sofrerá alguma penalidade. Mesmo o paciente que não concordar em participar do estudo, terá todos os benefícios de atendimento e de informações sobre novas descobertas com relação à doença, do que qualquer outro paciente que participar do estudo. A qualquer momento, o indivíduo tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade. O participante receberá uma via do termo de consentimento rubricada pelo pesquisador.

Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa - Caso aconteça algo que prejudique a sua saúde e que esteja relacionado com sua participação no estudo, é garantido pela lei brasileira que você receba indenização de acordo com o dano ou prejuízo causado durante a pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3°. andar, IMT II CEP: 05403-000, Telefone(s) (11) 3061-7499/7194. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID-19".

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Prof. Dr Alberto José da Silva Duarte) ou pessoa (s) por ele delegada (s) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

---------- Data____/____/_____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

---------- Data ____/____/_____

Nome resumido do projeto: Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias	**Confidencial**	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1.0 de 16 de abril de 2020		
Nome do pesquisador: Alberto José da Silva Duarte Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da USP		
	Rubrica do Participante da Pesquisa/Representante legal	Rubrica do Investigador Responsável

Atualizado-dezembro 2019

APÊNDICE C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

Número de aprovação no Comitê de ética: (CAAE 30800520.7.0000.0068-2020)