

Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas e Associação a Complicações Pulmonares Graves na Doença Covid-19

Gabrieli de Andrade¹
Bruna Letícia Schulz Oyczenasz²
Matias Nunes Frizzo³

Destaques:

- (1) A formação excessiva de NETs está associada como biomarcador de eventos trombóticos.
- (2) A hiperinflamação na Covid-19 contribui para a formação excessiva de NETs.
- (3) Existência de correlação positiva entre formação de NETs e gravidade na Covid-19.

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo descrever a associação entre a formação de NETs e o desenvolvimento de agravos pulmonares na Covid-19, bem como explorar o seu desempenho como biomarcador na doença. Trata-se de uma revisão bibliográfica integrativa de literatura, por meio do levantamento de artigos científicos nas bases de dados: PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line (Medline). A partir dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 18 artigos para essa revisão. A ativação de neutrófilos e a formação de NETs foram descritos como principais fatores de risco para a mortalidade em pacientes Covid-19. A liberação de NETs correlaciona-se significativamente com a gravidade da patologia pulmonar. Por meio desse estudo conclui-se que formação de NETs excessivos está presente em casos graves de Covid-19 e associada como um biomarcador de diversas complicações, como trombose e coagulopatias.

Palavras-chave: NETs; Covid-19; coronavírus; lesão pulmonar.

NEUTROPHILIC EXTRACELLULAR TRAPS AND ASSOCIATION WITH SERIOUS PULMONARY COMPLICATIONS AT COVID-19

ABSTRACT

The present study aims to define an association between the formation of NETs and the development of pulmonary disorders in Covid-19, as well as to explore its performance as a biomarker in the disease. This is an integrative literature review, through the survey of scientific articles in the following databases: PubMed, Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences (Lilacs) and Online Medical Literature Analysis and Recovery System (Medline) Based on the inclusion and exclusion criteria, 18 articles were selected for this review. Activation of neutrophils and formation of NETs have been defined as risk factors for mortality in Covid-19 patients. The release of NETs is fully correlated with the severity of the pulmonary pathology. Throughout this study, it is concluded that the formation of excess NETs is present in severe cases of COVID-19 and associated as a biomarker of several complications such as thrombosis and coagulopathies.

Keywords: NETs; Covid-19; coronavirus; lung injury.

¹ Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí. Ijuí/RS, Brasil. <https://orcid.org/0009-0001-5475-1083>

² Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde – PPGAIS. Ijuí/RS, Brasil. <https://orcid.org/0009-0004-6027-3147>

³ Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí. Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde – PPGAIS. Ijuí/RS, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-5578-4656>

INTRODUÇÃO

A doença viral Covid-19, causada pelo coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (Sars-CoV-2), tem ameaçado a saúde humana e a segurança pública,¹ já com mais de 5,18 milhões de mortes.² Na maioria dos casos de Covid-19, manifestam-se sintomas leves como gripe, febre, tosse e dor de garganta. Em aproximadamente 10% dos indivíduos, no entanto, a infecção por Sars-CoV-2 pode induzir insuficiência respiratória letal, que lembra a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)³. As respostas imunotrombóticas e hiperinflamatórias causadas pelo Sars-CoV-2 são consideradas as principais causas de insuficiência respiratória e morte, mas a fisiopatologia da doença decorre de alterações imunopatológicas pulmonares.⁴

A infecção pelo Sars-CoV-2 e a consequente destruição de células pulmonares desencadeiam uma resposta imune local, devido ao recrutamento de macrófagos/monócitos e neutrófilos que reagem à infecção. Os macrófagos também atuam na liberação de citocinas e na mediação (apresentação de antígenos) de respostas imunes adaptativas de células T e B. Esse processo é capaz de resolver a infecção na maioria dos casos, no entanto pode ocorrer uma resposta imune disfuncional responsável por uma patologia pulmonar grave e até sistêmica.⁵

Quando células humanas são infectadas por vírus, ocorre a apresentação de antígenos virais para células T e B por meio do complexo de histocompatibilidade (MHC) e células apresentadoras de antígenos (APCs) e subsequente ativação dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa.⁶ A partir do reconhecimento das células infectadas, pelos sistemas imunes, tanto inato como adaptativo, inicia-se a produção de citocinas. Destacam-se entre as principais citocinas produzidas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon-gama (IFN- γ). O TNF- α é responsável pela ativação neutrofílica, promoção da coagulação e atuação a nível central para o desenvolvimento de febre; o interferon-gama induz à atividade macrofágica de destruição do patógeno e amplia a liberação de citocinas (pró-inflamatórias, pró-fibróticas e regulatórias da resposta imune).⁵ A produção exacerbada de citocinas promove um aumento do número de neutrófilos circulantes e tem sido descrita como um indicador da gravidade dos sintomas respiratórios e de desfecho clínico ruim na Covid-19.⁷ Os neutrófilos são as células mais abundantes do sistema imunológico inato,⁸ e desenvolvem um papel essencial para a proteção dos tecidos contra agressores, promovendo uma resposta celular rápida e diversificada aos microrganismos, bem como também atuam no reparo e renovação tecidual após o processo inflamatório e/ou infeccioso.⁹ A eliminação de microrganismos pelos neutrófilos ocorre mediante mecanismos inespecíficos, como o estresse oxidativo e a produção de vários fatores antimicrobianos. As principais estratégias utilizadas para controlar infecções incluem fagocitose ou liberação de mediadores citotóxicos derivados de grânulos.¹⁰

Os agravos do quadro clínico e laboratorial da Covid-19 estão relacionados com a morte dos neutrófilos e a expressiva formação das Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas – Neutrophil Extracellular Traps (NETs), contribuindo para um aumento da resposta inflamatória e evolução desfavorável da doença.¹¹ Os NETs são liberados pelos neutrófilos, após a morte (NETosis) ou não dessas células, e consistem em estruturas grandes, extracelulares, semelhantes a teias, compostas por fibras de DNA associadas a vários fatores antimicrobianos como: histonas citrulinadas, defensinas, elastase neutrofílica (NE) e mieloperoxidase (MPO). As armadilhas são muito eficientes na captura e destruição de patógenos, mantendo localizada a infecção e limitando a disseminação de bactérias, vírus ou fungos.¹²

Ou seja, durante a resposta inflamatória, citocinas como a interleucina IL-1 β , induzem dois grandes eventos intracelulares em neutrófilos: descarga de antimicrobianos de grânulos, bem como a descondensação e descarga de cromatina do núcleo.¹³ Recentemente, a formação de NETs foi proposta

como um mecanismo distinto de resposta imune inata, pelo qual os neutrófilos localizam e matam os patógenos.¹⁰

Os efeitos da formação de NETs em alta quantidade no hospedeiro podem ser prejudiciais, devido à toxicidade de seus compostos e exposição às células endoteliais e tecido parenquimatoso.¹⁴ Na Covid-19, especificamente, as citocinas induzem a geração de material antimicrobiano extracelular por células imunes inatas, como a produção de NETs, resultando na produção exacerbada de citocinas e em um quadro imunológico prejudicial ao indivíduo.³ Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo descrever a associação entre a formação de NETs e o desenvolvimento de agravos pulmonares na Covid-19, bem como explorar o seu desempenho como biomarcador na doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

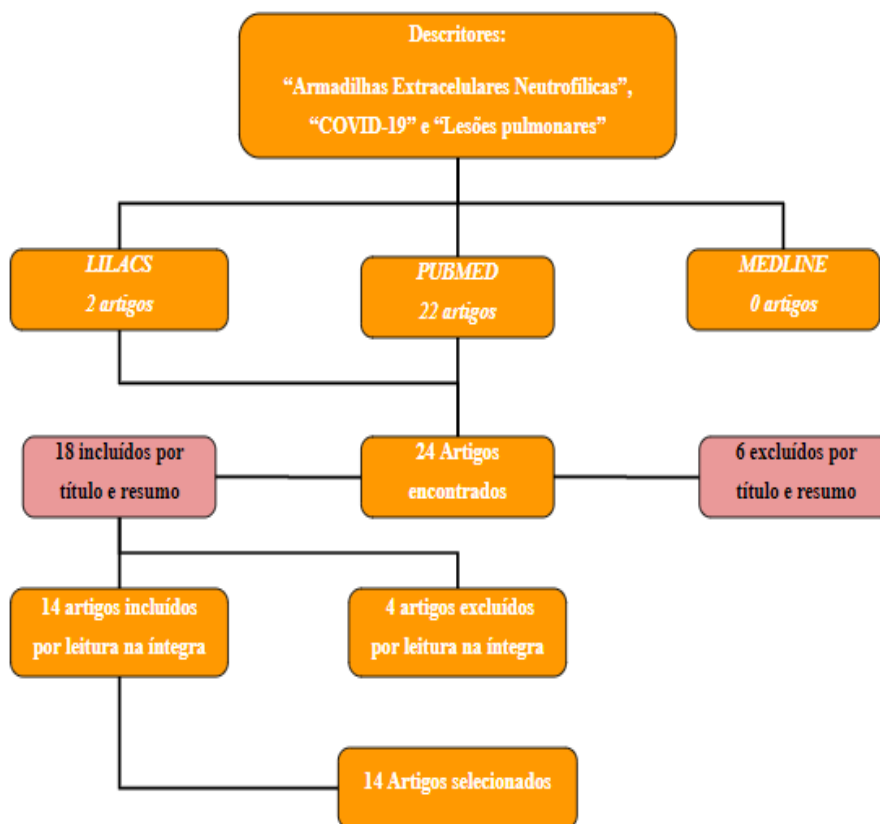
O presente estudo foi desenvolvido na forma de uma revisão integrativa de literatura, observando-se que para o levantamento dos artigos científicos realizou-se uma busca nas bases de dados: PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line (Medline). Foram utilizados, para busca dos artigos, os seguintes descritores e suas combinações nas línguas portuguesa e inglesa: “Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas”, “Covid-19” e “Lesões pulmonares”.

Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em português, inglês e espanhol; artigos na íntegra que retratam a temática referente à revisão integrativa e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados nos últimos cinco anos, com a pesquisa de artigos sendo realizada de junho a dezembro de 2021.

A análise dos estudos selecionados, em relação ao delineamento de pesquisa, e a síntese dos dados extraídos dos artigos foram realizadas de forma descritiva, possibilitando observar, descrever e classificar os dados, com o intuito de reunir o conhecimento produzido sobre o tema explorado na revisão.

A amostra final desta revisão foi constituída por 24 artigos científicos. Destes, 22 foram encontrados na base de dados PubMed, 2 artigos foram encontrados na base de dados Lilacs e nenhum artigo foi encontrado na base de dados Medline. A partir dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 14 artigos para essa revisão, conforme demonstra a Figura 1 por meio de um fluxograma da análise dos artigos encontrados.

Figura 1 – Fluxograma de análise dos artigos



Fonte: Os autores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a seleção, leitura e análise dos artigos, identificamos as 4 principais categorias temáticas: 1) *Liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias e geração de resposta imune excessiva através das NETs* (três artigos); 2) *Ativação da via intrínseca da coagulação por NETs e modulação da resposta hipercoagulativa* (cinco artigos); 3) *Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas como biomarcadores de agravos em pacientes com Covid-19* (três artigos); 4) *NETs como alvo de estratégias terapêuticas para Covid-19* (três artigos).

Os artigos selecionados e analisados estão apresentados no Quadro 1 com título, numeração correspondente à categoria temática, autores e ano de publicação, população amostral, tipo de estudo, objetivo, principais resultados e principais conclusões.

Quadro 1 – Distribuição das referências incluídas na revisão integrativa, de acordo com título, ano de publicação e autores, objetivo, principais resultados e conclusões

ARTIGO	CATEGORIA (Nº)	AUTORES/ANO	OBJETIVO	AMOSTRA	TIPO DE ESTUDO	RESULTADOS	CONCLUSÕES
Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19¹⁵	1	Wang et al. 2020	Esclarecer a patogênese de neutrófilos que levam a pneumonia grave na Covid-19.	Pacientes com Covid-19 leve (n=22), moderado (n=25) e grave (n=8)	Estudo retrospectivo.	<ul style="list-style-type: none"> – Neutrofilia após 7-19 dias do início dos sintomas, associada à progressão da lesão. – Aumento na contagem absoluta de neutrófilos em pacientes graves, associada com lesões pulmonares induzidas por neutrófilos e caracterizadas por tomografia. – A análise transcricional demonstrou que a ativação de neutrófilos está correlacionada com 17 genes codificantes de proteínas de armadilhas extracelulares neutrófilos (NET). 	<ul style="list-style-type: none"> – Aumento na contagem de neutrófilos e NETs estão associados com a patogênese da Covid-19 e agravos da doença por lesão pulmonar.
Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19¹⁶	2	Gustine et al. 2021	Compreender a fisiopatologia subjacente à síndrome hiperinflamatória em Covid-19 grave.	Estudo de revisão integrativa	Revisão integrativa da literatura	<ul style="list-style-type: none"> – A síndrome hiperinflamatória na Covid-19, compartilha características com linfo-histiocitose hemofagocítica induzida pelo vírus. – Inclui evidências de ativação de macrófagos e tempestade de citocinas, deficiência de células T- CD8, NK e macrófagos hemofagocíticos. 	<ul style="list-style-type: none"> – A resposta imune inata desregulada do hospedeiro está relacionada à síndrome hiperinflamatória na Covid-19.
Covid-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms¹⁷	2	Colling et al. 2020	Revisão sobre os achados laboratoriais e clínicos de pacientes com coagulopatia associada à Covid-19 e estudos prévios de homeostasia em outras infecções virais e síndrome de angústia respiratória aguda.	Estudo de revisão integrativa	Revisão integrativa da literatura	<ul style="list-style-type: none"> – Desequilíbrio entre coagulação e inflamação resulta em um estado hipercoagulável. – Trombose é iniciada pelo sistema imunológico inato (neutrófilos) para limitar a disseminação do SARS-CoV-2. – Ativação da resposta imune inata causa lesões endoteliais e perda de mecanismos trombotéticos com excessiva geração de trombina e trombose. – NETs ativam a via intrínseca da coagulação e modulam a resposta hipercoagulativa. 	<ul style="list-style-type: none"> – A presença de coagulopatia está associada com maior gravidade e mortalidade da Covid-19. – Coagulopatia da COVID-19 é distinta da induzida pela seps e pode refletir homeostasia desregulada, mediada pela ativação excessiva da resposta inata.

<p>Novel therapeutic targets for SARS-CoV-2-induced acute lung injury: Targeting a potential IL-1β/neutrophil extracellular traps feedback loop¹⁸</p>	<p>2</p>	<p>Yaqinuddin et al. 2020</p>	<p>Propor o uso de fármacos potenciais para aliviar patologias mediadas por SARS-CoV-2.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– IL-1β produzida na infecção por SARS-CoV-2 recruta e ativa neutrófilos, produzindo NETs excessivos. – Infecções por SARS-CoV-2 promovem migração maciça de neutrófilos para os alvéolos, produzindo quantidades excessivas de NETs e lesões pulmonares graves. – Mieloperoxidase produzida por NETs causa necrose epitelial, apoptose celular e ativação excessiva da coagulação.</p>	<p>– DNA dos NETs promove uma liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias e geração de uma resposta imune excessiva. – Lesões endoteliais resultam na liberação do fator Von Willebrand (vWF) e ativação de plaquetas e neutrófilos, os quais estimulam a produção de NETs e formação de coágulos.</p>
<p>Covid-19: Role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury³</p>	<p>1</p>	<p>Yaqinuddin et al. 2020</p>	<p>Relatar o papel das armadilhas extracelulares de neutrófilos na lesão pulmonar aguda</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– Trombose e choque séptico agravam o quadro pulmonar da Covid-19. – Infecções virais levam à ativação plaquetária, agregação com neutrófilos e maior formação de armadilhas extracelulares.</p>	<p>– Ensaio enzimático para relacionar a atividade de elastase neutrofílica (NE) e mieloperoxidase (MPO) podem ser empregados como estratégia prognóstica para avaliar lesões induzidas por NETs.</p>
<p>Immunomodulatory and Antiviral Activity of Metformin and Its Potential Implications in Treat Coronavirus Disease 2019 and Lung Injury¹⁹</p>	<p>1</p>	<p>Chen et al. 2020</p>	<p>Sintetizar a patogênese imunológica do SARS-CoV-2 e abordar os efeitos da metformina na inibição de tempestades de citocinas e na prevenção da infecção pelo SARS-CoV-2, bem como seus efeitos colaterais.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– A metformina tem atividades suppressivas na produção de citocinas pró-inflamatórias mediadas por macrófagos ativadas, a formação de NETs e as respostas imunes das células patogênicas Th1 e Th17.</p>	<p>– A inibição da resposta inflamatória pode ser uma estratégia promissora para mitigar a gravidade da doença. – O tratamento com metformina pode minimizar várias lesões pulmonares agudas e está associado à redução da mortalidade em pacientes diabéticos com Covid-19 grave.</p>

<p>Pulmonary pathology of COVID-19: a review of autopsy studies²⁰</p>	<p>2</p>	<p>Borcuk 2021</p>	<p>Revisar a patologia grave de Covid-19 através de estudos sobre a análise de exames <i>post mortem</i>.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– A maioria dos casos descritos com danos alveolares difusos (DAD) apresentam infiltração de linfócitos e macrófagos. – Atuação de um subconjunto de neutrófilos, com acúmulo intersticial distinto de neutrófilos e trombos. – Supuração é descrita em muitas séries, como broncopneumonia aguda e assumida como superinfecção e em proporção significativa.</p>	<p>– A lesão pulmonar em Covid-19 na autópsia é predominantemente por danos alveolares difusos, com presença de trombos e microtrombos. – A interação de lesões virais persistentes induzidas, resposta imune, disfunção endotelial sistêmica e trombose sugerem diferentes graus da Covid-19 e diferentes abordagens terapêuticas.</p>
<p>Design and Rationale of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2/3 Study Evaluating Dociparstat in Acute Lung Injury Associated with Severe COVID-19²¹</p>	<p>4</p>	<p>Lasky et al. 2021</p>	<p>Determinar a segurança e eficácia do Dociparstat (DSTAT) adicionado ao padrão de cuidado em adultos hospitalizados com Covid-19 que requerem oxigênio suplementar.</p>	<p>Pacientes hospitalizados com Covid-19</p>	<p>Ensaio randomizado, duplo-cego controlado</p>	<p>– A inibição do DSTAT sobre as atividades da proteína HMGB1 e fator plaquetário 4 (PF4) pode reduzir a formação de NETs e promover sua liberação – Covid-19 é caracterizada por hiper-reatividade plaquetária, que pode contribuir para a formação de NETs e coagulopatias com risco de vida.</p>	<p>– Dociparstat, foi considerada adequada para abordar a fisiopatologia de Covid-19 grave. – DSTAT fornece benefício adicional ao padrão de tratamento em pacientes com Covid-19 em risco de lesão pulmonar aguda, diminuindo significativamente sua necessidade de suporte ventilatório e melhorando os resultados gerais.</p>
<p>Hypothesis: Alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19²²</p>	<p>4</p>	<p>Bai et al. 2021</p>	<p>Demonstrar os diferentes meios pelos quais a Alfa-1-antitripsina (AAT) pode antagonizar mecanismos fisiopatológicos induzidos pelo SARS-CoV-2.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– A inibição de AAT da apoptose celular endotelial pode limitar a lesão endotelial ligada a lesões pulmonares agudas associadas à Covid-19, disfunção multiórgãos e síndrome pré-eclâmpsia vista em mulheres grávidas. – A inibição de elastase pode antagonizar a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs).</p>	<p>– A AAT tem o potencial de inibir a formação de NETs e reduzir a excessiva inflamação e a imunotrombose observada na Covid-19.</p>

<p>Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury²³</p>	<p>2</p>	<p><u>Obermayer et al.</u> 2021</p>	<p>Através de imuno-histoquímica e histoquímica rastrear NETs e seus marcadores moleculares no tecido pulmonar da autópsia de sete pacientes com Covid-19.</p>	<p>Amostras teciduais pós-mortem de lobos superiores de pacientes com Covid-19</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>– Os NETs estão presentes abundantemente no tecido pulmonar de Covid-19, seriamente danificado, especialmente em associação com microtrombos nos capilares alveolares. – Neutrófilos de baixa densidade (LDNs), que são especialmente propensos à NETosis, contribuem substancialmente para os danos pulmonares associados à Covid-19 em geral e em bloqueios vasculares.</p>	<p>– Achados imuno-morfológicos confirmam os achados histopatológicos sobre NETosis nos pulmões Covid-19. – Os NETs estão presentes abundantemente em tecido respiratório seriamente danificado e nas oclusões vasculares trombóticas – LDNs contribuem para a fisiopatologia Covid-19, com ênfase no bloqueio vascular e na formação de microtrombos.</p>
<p>Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease¹⁰</p>	<p>3</p>	<p><u>Szturmowicz et al.</u> 2021</p>	<p>Compreender o papel dos NETs no curso da Covid-19 e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens para intervenções terapêuticas</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– A relação de NETs e a doença Covid-19 é atribuída principalmente às propriedades pró-inflamatórias e pró-trombóticas dos NETs e seus componentes, bem como aos efeitos citotóxicos diretos dessas estruturas.</p>	<p>– NETs atuam como gatilhos de uma cascata de pró-reações inflamatórias e promoção da tempestade de citocinas na doença Covid-19.</p>
<p>Neutrophil Extracellular Traps Induce the Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Post-Covid-19 Fibrosis²⁴</p>	<p>3</p>	<p><u>Pandolfi et al.</u> 2021</p>	<p>Avaliar se a NETosis pode conduzir a Transição epitélio-mesenchimal (EMT) também em células epiteliais pulmonares e podem implicar na indução de EMT em pneumonia por SARS-CoV2 promovendo a fibrose.</p>	<p>Pacientes diagnosticados com Covid-19</p>	<p>Estudo observacional transversal</p>	<p>– Altas concentrações de NETs foram encontradas em fluidos de lavagem de broncoalveolar de pacientes graves Covid-19 e associação positiva com a contagem de neutrófilos; – A análise de tecidos pulmonares de pacientes falecidos pela Covid-19 demonstrou a indução do mecanismo EMT após grave infecção pelo SARS-CoV-2.</p>	<p>– Indução da fibrose pulmonar após a infecção pelo SARS-CoV-2. – Para desencadear um padrão completo de expressão EMT são necessários a indução de NETosis por SARS-CoV2 e a secreção de fatores macrófagos alveolares (TGF-β, IL8 e IL1β).</p>

<p>Interactions of Influenza and SARS-CoV-2 with the Lung Endothelium: Similarities, Differences, and Implications for Therapy²⁵</p>	<p>4</p>	<p>Latreille et al. 2021</p>	<p>Discutir a capacidade de indução de disfunção endotelial por infecção com influenza ou SARS-CoV-2. Comparar os efeitos dessas infecções virais, e discutir potenciais tratamentos.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– Neutrofilia em pacientes graves com SDRA Covid-19 em comparação com casos menos graves. – NETosis e vWF (marcador de lesão endotelial e NETosis) é aumentado nos pulmões com Covid-19.</p>	<p>– Os agentes que são eficazes contra a lesão pulmonar induzida por SARS-CoV-2 através de inibição da ativação de NETs e vWF demonstram aplicabilidade terapêutica.</p>
<p>Fisiología de la hemostasia y su alteración por la coagulopatía en Covid-19²⁶</p>	<p>3</p>	<p>González-Villalva et al. 2020</p>	<p>Revisar a fisiologia da hemostasia, trombose inflamatória secundária à infecção pelo SARS-CoV-2, fisiopatologia da coagulopatía no Covid-19 sob a perspectiva da ciência básica.</p>	<p>Estudo de revisão integrativa</p>	<p>Revisão integrativa da literatura</p>	<p>– Danos celulares induzem inflamação com a formação de NETs por neutrófilos, hiperativação de monócitos e macrófagos os quais desencadeiam uma tempestade de citocinas, perpetuando danos endoteliais e promovendo a coagulação.</p>	<p>– A resposta imune contra o vírus SARS-CoV-2 leva à coagulopatía caracterizada por danos endoteliais locais e sistêmicos predispondo à ativação de plaquetas, trombose e insuficiência fibrinolise.</p>

Fonte: Os autores.

Quanto à sistematização dos resultados encontrados em cada uma das categorias temáticas, descrevemos nos itens a seguir:

1) Liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias e geração de resposta imune excessiva através dos NETs

A infecção por Sars-CoV-2 ativa macrófagos alveolares ou células epiteliais para a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, desencadeando ou recrutando mais células imunes inatas e, assim, amplificando a inflamação.¹⁹ As citocinas induzem a geração de material antimicrobiano extracelular por células imunes inatas, como os NETs, que, por sua vez, amplificam a síntese de citocinas, criando um mecanismo contínuo que pode se tornar prejudicial.³

A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) causadas por infecções de Sars-CoV-2 apresentam uma migração maciça de neutrófilos para os alvéolos devido à produção de quimiocinas por células epiteliais e macrófagos.¹⁸ As células Th1 e Th17 também podem promover a ativação de células imunes inatas, produzindo citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN γ , IL-17 e TNF α .¹⁹ Esses mediadores permitem o recrutamento progressivo de várias células inflamatórias de circulação e seu fluxo para os pulmões.¹⁰

Além disso, a interleucina 1 beta (IL-1 β) produzida por inflamações pode recrutar e ativar neutrófilos, produzindo NETs excessivos,¹⁸ os quais podem contribuir para que ocorra insuficiência respiratória.¹⁵ A mieloperoxidase (MPO) produzida por NETs causa necrose epitelial e apoptose celular.¹⁸

Os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados por células epiteliais pulmonares feridas também podem ativar células imunes inatas, contribuindo na inflamação descontrolada.¹⁹ Além dos DAMPs, o DNA contido nos NETs possui propriedades antigênicas, sendo responsável por causar a liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias.¹ Os NETs também atuam ativando os macrófagos vizinhos na síntese de liberação de citocinas pró-inflamatórias, provocando assim uma resposta imune de ciclo contínuo entre IL-1 β e NETs.³

Outro aspecto importante destacado nos estudos avaliados é que as Armadilhas Extracelulares Neutrofílicas podem regular negativamente a função imunológica das células T e NK, levando à imunidade antiviral insuficiente e ferindo diretamente o tecido pulmonar.¹⁵

2) Ativação da via intrínseca da coagulação por NETs e modulação da resposta hipercoagulativa

Acredita-se que a formação de NETs esteja envolvida na morte de patógenos como resposta ao DNA extracelular; no entanto é possível que o excesso de formação líquida e ativação imunológica possam causar danos aos pulmões, induzindo à trombose.²⁰ A ocorrência de danos endoteliais durante a lesão endotelial resulta na liberação do fator Von Williebrand (vWF), que exerce a ativação de plaquetas e neutrófilos. As plaquetas ativadas estimulam os neutrófilos a produzir NETs.¹⁸ Os NETs promovem a adesão de plaquetas ativadas e glóbulos vermelhos aos filamentos de ácido nucleico. As fibras de DNA servem como um meio para a concentração de fatores de coagulação e formação de grandes conglomerados, causando obstrução local dos pequenos brônquios e que juntamente com a NE são responsáveis pela superprodução de mucina por células epiteliais.¹⁰

Um estudo realizado com autópsias de pacientes com Covid-19 identificou numerosos neutrófilos em achados de trombos microvasculares, que em alguns casos apresentavam-se parcialmente degenerados, consistentes e com armadilhas extracelulares de neutrófilos.¹⁷

Outro estudo apontou a elevação significativa de HMGB1 e fator plaquetário 4 em pacientes com Covid-19, os quais induzem a formação de NETs e regulam a degradação líquida. Além disso, a hiper-reatividade plaquetária novamente foi relatada como uma característica patológica relacionada à Covid-19, e sua contribuição para o desenvolvimento de coagulopatias com risco de vida associadas

à formação de NETs. Esse estudo relatou que em doenças graves, as plaquetas apresentam maior expressão de P-selectina, o que promove a formação de agregados de plaquetas e leucócitos. Esses agregados estão associados à hiper-reatividade plaquetária, imunotrombose e danos aos capilares pulmonares.²¹

As coagulopatias associadas à Covid-19 são atribuídas a vários mecanismos, incluindo ativação aberrante de respostas de células imunes, inflamação excessiva e imunotrombose. Embora os NETs sejam muitas vezes benéficos na captura e eliminação de patógenos, também podem causar lesões e agravos, como a trombose e necessidade de intubação e morte na Covid-19.²¹

Entre os vários mecanismos pelos quais a infecção por Sars-Cov-2 pode resultar em trombose microvascular e macrovascular, os NETs também foram descritos pela capacidade de iniciar as vias extrínsecas e de contato, aumentando a apresentação do fator tecidual, ativação do fator XII (FXII), bem como a captura e ativação de plaquetas. Consistente com essas observações, descreve-se que pacientes com Covid-19 grave possuem marcadores séricos elevados de ativação de neutrófilos e formação líquida.¹⁷ O excesso de formação líquida e ativação imunológica podem causar danos aos pulmões, induzindo à trombose.²⁰

Os NETs foram encontrados em vítimas de Covid-19 nas microvasculaturas pulmonares, renais e cardíacas, e foram considerados contribuintes para danos mediados por imunotrombose desses órgãos.¹⁰ Em amostras de soro de pacientes com Covid-19 foram encontrados marcadores de NETose abundantes, como DNA livre de células, DNA associado à mieloperoxidase (MPO-DNA) e histona citrulinada H3 (citH3), juntamente com níveis elevados da proteína C-reativa (PCR) e D-dímer.²³ DNA associado à mieloperoxidase (MPO-DNA) e histona citrulinada H3 (citH3) são considerados marcadores específicos para NET remanescentes.¹⁶ Os dados imuno-histoquímicos comprovam o papel da NETose na lesão pulmonar associada à Covid-19 e complicações tromboembólicas.²³

A resposta imune e os efeitos sistêmicos, incluindo o impacto da trombose em grandes vasos e microscópicos na gravidade da doença, é significativa, e pode ser mais frequente em lesões pulmonares graves por Covid-19 do que outras formas de lesão pulmonar aguda.²⁰ As evidências atuais indicam que a Covid-19 grave é um fenótipo específico de Síndrome de Angústia Respiratória Aguda (ARDS) frequentemente apresentando danos alveolares difusos (DAD), disfunção endotelial e um estado hipercoagulável.²³

3) Armadilhas Extracelulares Neutrofilicas como biomarcadores de agravos em pacientes com Covid-19

A lesão pulmonar aguda no curso da infecção por SARS-CoV-2, e sua forma mais grave – SDRA – é intimamente dependente da formação de NETs dentro do tecido pulmonar e vasculatura pulmonar. O endotélio pulmonar é um órgão-alvo chave na doença de Sars-CoV-2, posto que sua superfície expressa receptores alvos de vírus. A lesão celular endotelial grave na microvasculatura pulmonar é o fator mais crítico para a SDRA relacionada à Covid-19, contribuindo significativamente para o aumento da permeabilidade vascular, liberação de mediadores pró-inflamatórios, acúmulo e extravasamento de leucócitos, ativação de vias pró-coagulantes e interrupção da barreira alveolar-capilar.¹⁰

A ativação de neutrófilos e a formação de NETs têm sido descritas como os principais fatores de risco para a mortalidade em pacientes com Covid-19.²⁰ Pacientes com Covid-19 que desenvolvem SDRA apresentam aumento de NETs no soro e, o mais importante, a liberação de NETs correlaciona-se significativamente com a gravidade da patologia pulmonar. A consequência direta da persistência dos NETs no pulmão é o dano de células epiteliais e endoteliais, impulsionadas predominantemente por histonas.²⁴

De acordo com trabalhos recentes, as amostras de lavados broncoalveolares de pacientes com Covid-19 grave internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) possuem quantidades significati-

vamente maiores de NETs em comparação às amostras de pacientes com Covid-19 leve, admitidos na Ala de Medicina Intermediária (IMW). O grupo total de pacientes não sobreviventes observados apresentou quantidades mais elevadas de NETs em comparação com os pacientes que sobreviveram às complicações da doença.²⁴ Também se descreve o aumento de neutrófilos em pacientes graves da Covid-19 com SDRA em comparação a casos menos graves. Além disso, ocorre o aumento de vWF (marcador de lesão endotelial e NETosis) nos pulmões com Covid-19 em comparação com a faixa de referência normal.²⁵

Segundo González-Villalva et al.,²⁶ pacientes com doença grave e entubados possuem valores no plasma significativamente mais elevados nos complexos mieloperoxidase-DNA e histona 3 citrulinada, marcadores de NETs; e em medidas de calprotectina, marcador de ativação de neutrófilos,²⁶ juntamente com elevação dos níveis de proteína C-reativa (PCR) e D-dímero.²³ Essas variáveis associam-se ao aumento do risco de complicações respiratórias e trombóticas fatais. Um aumento da razão neutrófilo/linfócito também está associado ao aumento da gravidade. Além disso, plaquetas ativadas a partir de danos endoteliais contribuem para a ativação de neutrófilos nos alvéolos, que perpetuam trombose e inflamação.²⁶

4) NETs como alvo de estratégias terapêuticas para Covid-19

A Covid-19 causa lesões pulmonares graves e danos múltiplos nos órgãos, tornando urgente a necessidade de novos medicamentos.¹⁹ Os esforços atuais para agilizar a disponibilidade terapêutica com um perfil de risco/benefício positivo incluem a redefinição de uso de medicamentos aprovados ou já em desenvolvimento avançado para outras indicações.²¹ Neste contexto, algumas das opções terapêuticas conhecidas e seguras para bloquear os eixos NETs-IL1 β incluem o uso de DNase-1 recombinante (dornase alfa), sivelestat (inibidor de NE) e anakinra (inibidor IL-1 β).³

A metformina foi relatada em um dos estudos por possuir atividades supressivas na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados, na formação de NETs e as respostas imunes das células patogênicas Th1 e Th17. Ocasionalmente, porém, tem efeitos colaterais adversos, incluindo efeitos colaterais cutâneos, gastrointestinais e acidose láctica.¹⁹

O DSTAT também foi apresentado por inibir a atividade da proteína caixa de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), uma citocina que desempenha um papel importante na patogênese das doenças imunológicas. A elevação de HMGB1 no soro está fortemente associada à gravidade clínica e mortalidade em pacientes de Covid-19. Juntamente com o fator plaquetário 4 (PF4), também significativamente elevado em pacientes com Covid-19, induz à formação de NETs e regula a degradação líquida. A inibição das atividades de HMGB1 e PF4 por DSTAT pode reduzir a formação de NETs e promover sua liberação.²¹

Alpha-1-antitrypsin (AAT) foi relatada por seu potencial de impedir a formação de NETs e reduzir a inflamação excessiva e a imunotrombose vista com Covid-19 através da inibição da elastase, a qual desempenha um papel fundamental na formação de NETs, degradando histonas específicas e promovendo a descondensação da cromatina.²²

Outro aspecto relevante é de que na fisiopatologia da Covid-19, a hiperinflamação causada pela infecção por Sars-CoV-2 contribui para a formação excessiva de NETs, que apesar de apresentar um papel essencial para a limitação da disseminação do vírus, resulta em uma resposta imune desregulada e prejudicial. Por meio da formação dos NETs, células sanguíneas, como as hemácias e plaquetas, ficam aderidas a essas armadilhas, formando trombos na microvasculatura dos pulmões. Ademais, a maioria dos casos graves de Covid-19 evoluem para lesões pulmonares agudas, causando sequelas graves e levando a óbito, e a formação de NETs tem sido um fator que colabora para desfechos clínicos ruins, como demonstrado nesses estudos.¹⁰

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o papel dos NETs na Covid-19 é uma temática essencial ainda a ser discutida e investigada, visto que há uma quantidade pequena de estudos diante da importância que esse tema tem apresentado. Desta forma, demonstramos neste estudo que a formação de NETs excessivos está presente em casos graves de Covid-19 e associada como um biomarcador de diversas complicações como trombose e coagulopatias.

A compreensão detalhada das ações das NETs na fisiopatologia da Covid-19 é essencial para que se desenvolvam estudos a fim de contribuir tanto para o tratamento da Covid-19 como de outras doenças em que a formação de NETs esteja associada ao desenvolvimento de agravos.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar dos resultados promissores observados neste estudo, algumas limitações podem influenciar a interpretação dos resultados. Tais limitações envolvem o viés de seleção de base de dados, limitando a busca de outros estudos, assim como a amostra final de 14 artigos incluídos, a qual pode afetar a generalização dos resultados.

REFERÊNCIAS

- ¹ Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [Internet]. 2020 Oct. 6;19:1-14. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7#citeas>
- ² World Health Organization. WHO COVID-19 dashboard [Internet]. World Health Organization; 2021 [cited 2021 Nov. 28]. Disponível em: <https://covid19.who.int/>
- ³ Yaqinuddin A, Kvietyš P, Kashir J. COVID-19: Role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. *Respiratory Investigation*. 2020 Sept.;58(5):419-420.
- ⁴ Radermecker C, Detrembleur N, Guiot J, Cavalier E, Henket M, d'Emal C, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 2020 Sept. 14 [cited 2021 Nov. 28];217(12). Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/217/12/e20201012/152084/Neutrophil-extracellular-traps-infiltrate-the-lung>
- ⁵ Brandão SCS, Godoi ETAM, Ramos J de OX, Melo LMMP de, Sarinho ESC. COVID-19 grave: entenda o papel da imunidade, do endotélio e da coagulação na prática clínica. *Jornal Vasculiar Brasileiro* [Internet]. 2020;19. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jvb/v19/1677-5449-jvb-19-e20200131.pdf>
- ⁶ Niedźwiedzka-Rystwej P, Grywalska E, Hryniewicz R, Bębnowska D, Wołęciewicz M, Majchrzak A, et al. Interplay between Neutrophils, NETs and T-Cells in SARS-CoV-2 Infection – A Missing Piece of the Puzzle in the COVID-19 Pathogenesis? *Cells* [Internet]. 2021 July 1 [cited 2021 Nov. 28];10(7):1817. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/7/1817>
- ⁷ Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2020 Aug;54:62-75.
- ⁸ Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* [Internet]. 2017 Oct. 9 [cited 2019 Feb. 28];18(2):134-147. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.105>
- ⁹ Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization. *Developmental Cell*. 2018 Mar;44(5):542-553.
- ¹⁰ Szturmowicz M, Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Severe SARS-CoV-2 Lung Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Aug. 17;22(16):8854.
- ¹¹ Silva de Sordi LH, Sales Oliveira Magalhães I, Abreu Casselhas D, Chaves Andrade M. O Papel da Imunidade Inata na COVID-19. *Revista Ciências em Saúde*. 2020 July 2;10(3):5-8.
- ¹² Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2012 Sep. 6 [cited 2019 Feb. 28];189(6):2689-2.695. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439169/>

- ¹³ Boeltz S, Amini P, Anders H-J, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation* [Internet]. 2019 Mar. 1 [cited 2021 Nov. 28];26(3):395-408. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41418-018-0261-x>
- ¹⁴ Thierry AR, Roch B. Neutrophil Extracellular Traps and By-Products Play a Key Role in COVID-19: Pathogenesis, Risk Factors, and Therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Sep. 11;9(9):2942.
- ¹⁵ Wang J, Li Q, Yin Y, Zhang Y, Cao Y, Lin X, et al. Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2020 Aug. 18;11.
- ¹⁶ Gustine JN, Jones D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *The American Journal of Pathology*. 2020 Sep.
- ¹⁷ Colling ME, Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vascular Medicine*. 2020 Jun. 19;1358863X2093264
- ¹⁸ Yaqinuddin A, Kashir J. Novel therapeutic targets for SARS-CoV-2-induced acute lung injury: Targeting a potential IL-1 β /neutrophil extracellular traps feedback loop. *Medical Hypotheses*. 2020 Oct.;143:109906.
- ¹⁹ Chen X, Guo H, Qiu L, Zhang C, Deng Q, Leng Q. Immunomodulatory and Antiviral Activity of Metformin and Its Potential Implications in Treating Coronavirus Disease 2019 and Lung Injury. *Frontiers in Immunology*. 2020 Aug. 18;11.
- ²⁰ Borczuk AC. Pulmonary pathology of COVID-19. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2021 Jan. 4; Publish Ahead of Print.
- ²¹ Lasky JA, Fuloria J, Morrison ME, Lanier R, Naderer O, Brundage T, et al. Design and Rationale of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2/3 Study Evaluating Dociparstat in Acute Lung Injury Associated with Severe COVID-19. *Advances in Therapy*. 2020 Oct. 27;38(1):782-791.
- ²² Bai X, Hippensteel J, Leavitt A, Maloney JP, Beckham D, Garcia C, et al. Hypothesis: Alpha-1-antitrypsin is a promising treatment option for COVID-19. *Medical Hypotheses*. 2021 Jan.;146:110394.
- ²³ Obermayer A, Jakob L-M, Haslbauer JD, Matter MS, Tzankov A, Stoiber W. Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury. Pichler R, editor. *Disease Markers* [Internet]. 2021 Jul. 30 [cited 2021 Nov. 28];2021:1-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34367376/>
- ²⁴ Pandolfi L, Bozzini S, Frangipane V, Percivalle E, De Luigi A, Violatto MB, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce the Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Post-COVID-19 Fibrosis. *Frontiers in Immunology*. 2021 Jun. 14;12.
- ²⁵ Latreille E, Lee WL. Interactions of Influenza and SARS-CoV-2 with the Lung Endothelium: Similarities, Differences, and Implications for Therapy. *Viruses* [Internet]. 2021 Jan 22 [cited 2021 Nov. 28];13(2):161. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499234/>
- ²⁶ González-Villalva A, De La Peña-Díaz A, Rojas-Lemus M, López-Valdez N, Ustarroz-Cano M, García-Peláez I, et al. Fisiología de la hemostasia y su alteración por la coagulopatía en COVID-19. *Revista de la Facultad de Medicina* [Internet]. 2020 [cited 2020 nov. 2];63. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2020/un205h.pdf>

Submetido em: 22/12/2021

Aceito em: 19/9/2023

Contribuições dos autores:

Concepção e desenho do estudo:

Gabrieli de Andrade
Matias Nunes Frizzo

Revisão de literatura:

Gabrieli de Andrade
Bruna Letícia Schulz Oyczenasz
Matias Nunes Frizzo

Aquisição de dados:

Gabrieli de Andrade

Análise e interpretação de dados:

Gabrieli de Andrade
Bruna Letícia Schulz Oyczenasz
Matias Nunes Frizzo.

Elaboração do manuscrito:

Gabrieli de Andrade
Matias Nunes Frizzo.

Revisão intelectual do manuscrito:

Bruna Letícia Schulz Oyczenasz
Matias Nunes Frizzo

Todos os autores aprovaram a versão final do texto.

Conflito de interesse: Não há conflito de interesse.

Autor correspondente:

Matias Nunes Frizzo
Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Unijuí
Rua do Comércio 3000, Bairro Universitário, Ijuí – RS. CEP: 98700-000.
E-mail: matias.frizzo@unijui.edu.br

EDITORES

Editora associada: Dra. Evelise Moraes Berlezi
Editora-chefe: Dra. Adriane Cristina Bernat Kolankiewicz

Todo conteúdo da Revista Contexto & Saúde
está sob Licença Creative Commons CC – By 4.0.