

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS ASSOCIADAS AO ESTADO INFLAMATÓRIO DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS POR COVID-19 E O IMPACTO NA MORTALIDADE.**

DOUTORANDO: Carolina Vicentini Verdi

ORIENTADOR: Prof. Dra. Andrea Novais Moreno-Amaral

CURITIBA

ANO 2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, NSA e a minha Família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família por permitir a realização deste sonho, por todo apoio, compreensão, carinho e financiamento;

Aos meus pais sempre presentes, me encorajando e não deixando eu desistir e sempre acreditando que os estudos são tesouros eternos;

Ao meu marido que compreendeu cada momento de ausência e que cuidou do nosso filho quando o compromisso com o estudo “falava” mais alto;

Ao meu amado filho que mesmo sem entender muito este processo esteve ao meu lado, vibrou comigo cada etapa conquistada e comemorou este título tão emocionado que jamais esquecerei;

A minha querida orientadora Profa. Dra. Andrea Novais Moreno, mulher admirável tanto com ser humano como cientista, jamais esquecerei todo conhecimento adquirido, todo companherismo, toda dedicação e apoio;

As meninas do laboratório e grupo de estudos, minha eterna gratidão por tudo que fizeram por mim e por este trabalho;

Aos colegas do Dinter obrigada pela companhinha durante esses 4 anos;

Ao amigo que esta jornada trouxe, Paulo Geraldo, muito obrigada pelas horas de estudo, desabafos e companherismo;

Aos meus amigos e amigas que torceram por este momento, me incentivando, apoiando e ajudando todas as vezes que precisei;

Ao UniSALESIANO Araçatuba por apoiarem essa jornada;

A Deus meu fiel amigo que não me abandonou por nenhum instante, meu muito obrigada.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Escola de Medicina e Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos **02 dias do mês de maio de 2023 às 14:00**, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese **“ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS ASSOCIADAS AO ESTADO INFLAMATÓRIO DE PACIENTES COM COVID-19 HOSPITALIZADOS E O IMPACTO NA MORTALIDADE”** apresentado por **Carolina Rúbio Vicentini Verdi** para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral - Presidente	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Prof. Dr. Thyago Proença de Moraes (PUCPR)	
Profa. Dra. Eliane Patrícia Cervelatti Mendonça (UniSalesiano)	
Profa. Dra. Ana Carolina Frade Gomes (UniSalesiano)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral

Conceito: Aprovada

Profa. Dra. Selene Elifio Esposito

Conceito: Aprovada

Prof. Dr. Thyago Proença de Moraes

Conceito: Aprovada

Profa. Dra. Eliane Patrícia Cervelatti Mendonça

Conceito: Aprovada

Profa. Dra. Ana Carolina Frade Gomes

Conceito: Aprovada

Parecer Final: **APROVADA**

Observações da Banca Examinadora:



Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral
PRESIDENTE DA BANCA EXAMINADORA
PUCPR



Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
COORDENADORA DO PPGCS-

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela Vancouver. Este trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório Pesquisa em Anemia e Imunologia (LabAIRE), localizado no Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, a coleta de dados e amostra biológica ocorreu no Hospital Marcelino Champagnat (HMC) localizado em Curitiba, Paraná. Declaramos que não há conflitos de interesse na realização da presente tese.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características da população.....	28
Tabela 2 - Variáveis relativas aos Parâmetros Hematológicos.....	28
Tabela 3- Comparação das Alterações Hematológicas com a idade e IMC.....	29
Tabela 4 - Comparação dos Parâmetros Leucocitários com as Citocinas	30
Tabela 5 - Comparação das classificações de Linfócitos em relação a citocinas	30
Tabela 6 - Comparação do número de Plaquetas em relação as Citocinas.....	31
Tabela 7 - Associação dos Parâmetros Hematológicos com o Desfecho óbito.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contextualização do Histórico do Corona Vírus.....	13
Figura 2: Estrutura do Corona Vírus.....	14
Figura 3: Fisiopatologia da Covid - 19	16
Figura 4: Fluxograma dos participantes do estudo.....	25
Figura 5: Coleta e armazenamento das amostras no hospital Marcelino Champagnat.....	26
Figura 6: Associação conjunta dos números de leucócitos quanto a classificação de normalidade, leucopenia e leucocitose e as citocinas IL-1b e IL-10 com a probabilidade de óbito.....	32
Figura 7: Associação conjunta dos números de linfócitos quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas IL-4, IL-6 e IFN-g com a probabilidade de óbito.....	33
Figura 8: Associação conjunta dos números de linfócitos quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas TNF- α , IL-15, IL-1b e IL-10 com a probabilidade de óbito.....	34
Figura 9: Associação conjunta dos números de plaquetas quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas IL-10, IFN-g e IL-1b com a probabilidade de óbito.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19: Doença do Corona Vírus de 2019.

DRA: Doença respiratória aguda.

ECA-2: Enzima Conversora de Angiotensina 2.

G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos.

IFN γ : Interferon gama.

IL-10: Interleucina 10

IL-2: Interleucina 2

IL-6: Interleucina 6

IL-4: Interleucina 4

IL-15: Interleucina 15

IL-1 β : Interleucina 1 beta

LabAIRE: Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia.

MCP1: Proteína inflamatória de macrófago 1.

MERS: Síndrome respiratória do Oriente Médio do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*.

MIP1 α : Proteína inflamatória de macrófago alfa.

MIP1 β : Proteína inflamatória de macrófago beta.

PCR: Proteína C reativa.

PPGCS: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

RNA: Ácido ribonucleico.

ROC: Curva Característica de Operação do Receptor do inglês *Receiver Operating Characteristic Curve*.

SARA: Síndrome da angústia respiratória aguda

SARS-CoV-2: Síndrome respiratória aguda grave do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*.

SARS-CoV: Síndrome respiratória aguda grave do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*.

SSTII: Tubo separador de soro.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

Us-PCR: proteína C reativa ultrasensível.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A infecção por SARS-CoV-2 foi caracterizada pela ativação do sistema imune com alta e constante liberação de citocinas. Esta resposta inflamatória excessiva ao SARS-CoV-2 é considerada uma das principais causas do agravamento da doença e morte em pacientes com COVID-19 e coincide com a descrição de alterações hematológicas como leucopenia, linfopenia e trombocitopenia nesta população. **OBJETIVO:** Correlacionar as alterações hematológicas com variáveis clínicas e inflamatórias em pacientes internados com COVID-19. **METODOLOGIA:** O estudo foi realizado em um hospital terciário privado no período de abril de 2020 a agosto de 2021. Os dados clínicos e laboratoriais foram adquiridos dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo. A partir dos valores obtidos do hemograma, os pacientes foram separados quanto a presença ou não de leucopenia, linfopenia e plaquetopenia. As dosagens das citocinas IL-6, IL-10, IL-4, IL-15, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ foram realizadas pelo método ELISA. Análise estatística foi realizada através do programa IBM SPSS Statistic v.200 Armonk NY: IBM Corp. **RESULTADOS:** Este estudo contou com a participação de 390 pacientes. A média de idade da amostra foi de 54,6 $\pm$ 16,4, sendo 26,9% com idade maior que 65 anos. A Doença Cárdio-metabólica foi presente em grande parte da amostra (52,2%). Os resultados demonstraram linfopenia em 34,3% da população de estudo, leucopenia em 4,1%, leucocitose em 17,3% e plaquetopenia em 26,2%. Na comparação das alterações hematológica, não foi observado correlação com idade e IMC. Indivíduos linfopênicos tiveram 3 vezes maior probabilidade de morte (p=0.006), além da correlação positiva com IL-4 (p=0.03), IL-6 (p=0.021) e IFN- γ (p=0.014). A correlação entre leucocitose foi positiva com IL-1 β (p=0,006), enquanto leucopenia foi correlacionada com IL-10 (p=0,006). A trombocitopenia foi correlacionada com IL-10 (p=0,006) e IFN- γ (0,019). Quando a probabilidade de morte foi analisada em um modelo termo quadrático, a alta probabilidade de morte foi correlacionada principalmente com a interação da linfopenia com níveis elevados de IL-6 (p=0,002), IFN- γ (p=0,019), TNF - α (p=0,049), IL-15 (p=0,002), IL-1 β (p=0,002) e IL-10 (p=0,004). **CONCLUSÕES:** Pacientes com COVID-19 apresentaram alterações hematológicas que estão associados o risco de morte. Juntos esses resultados sugerem que principalmente a linfopenia seja uma variável de observação clínica importante para a identificação precoce e a melhora do manejo de pacientes com COVID-19 grave.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, Leucopenia, Leucocitose, Trombocitopenia, Citocinas

ABSTRACT

INTRODUCTION: SARS-CoV-2 infection was characterized by activation of the immune system with the high and constant release of cytokines. This excessive inflammatory response to SARS-CoV-2 is considered a significant cause of disease worsening and death in COVID-19 patients. It coincides with hematological alterations, such as leukopenia, lymphopenia, and thrombocytopenia in this population. **OBJECTIVE:** To correlate hematological alterations with clinical and inflammatory variables in patients hospitalized with severe COVID-19. **METHODOLOGY:** The study was carried out at Hospital Marcelino Champagnat from April 2020 to August 2021. Clinical and laboratory data were acquired from the patient's medical records included in the study. From the values obtained from the blood count, the patients were separated according to the presence or absence of leukopenia, lymphopenia, and thrombocytopenia. The dosages of cytokines IL-6, IL-10, IL-4, IL-15, IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ were performed by the ELISA method. Statistical analysis was performed using the IBM SPSS Statistic v.200 program Armonk NY: IBM Corp. **RESULTS:** This study had the participation of 390 patients. The mean age of the sample was 54.6 ± 16.4 , with 26.9% aged over 65 years. Cardio-metabolic disease was present in most of the sample (52.2%). The results showed lymphopenia in 34.3% of the study population, leukopenia in 4.1%, leukocytosis in 17.3%, and thrombocytopenia in 26.2%. Comparing hematological alterations, no correlation was observed between age and BMI. Lymphopenic individuals have almost 3 times increased risk of death ($p=0.006$), in addition to the positive correlation with IL-4 ($p=0.03$), IL-6 ($p=0.021$), and IFN- γ ($p=0.014$). The correlation between leukocytosis was positive with IL-1 β ($p=0.006$), while leukopenia was correlated with IL-10 ($p=0.006$). Thrombocytopenia was correlated with IL-10 ($p=0.006$) and IFN- γ ($p=0.019$). When the probability of death was analyzed in a statistical model of logistic regression, the high probability of death was correlated mainly when lymphopenia was present with increased levels of IL-6 ($p=0.002$), IFN- γ ($p=0.019$), TNF- α ($p=0.049$), IL-15 ($p=0.002$), IL-1 β ($p=0.002$) and IL-10 ($p=0.004$). **CONCLUSIONS:** Patients with COVID-19 have hematological changes that are associated with the risk of death. Together, these results suggest that lymphopenia is an essential clinical observation variable to ensure the best prevention and management of patients with severe COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, Leukopenia, Leukocytosis, Thrombocytopenia, Cytokines

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. REVISÃO LITERATURA.....	13
4. OBJETIVO GERAL.....	22
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. HIPOTESE.....	23
6. MÉTODOS	24
7. RESULTADOS	27
8. DISCUSSÃO.....	32
9. CONCLUSÃO	37
10. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Os casos graves da COVID-19 foram associados com alguns fatores de risco tais como idade avançada, obesidade, sexo masculino, presença de comorbidades como *diabetes mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doença cardiovascular (1–3). Ainda, a gravidade da doença foi associada por internação prolongada em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), necessitando de suporte invasivo (4). Ainda, os casos graves da doença foram relacionados a uma inflamação acentuada, caracterizada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios, sendo reconhecida como tempestade de citocinas (5). Casos graves da doença mostraram que alterações nos níveis de citocinas, como demonstrado em vários estudos, como aumento de nível sérico de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL10, IL-12, relacionavam-se com a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) ou *severe acute respiratory syndrome* (SARS), falência múltipla dos órgãos, levando muitas vezes ao desfecho óbito (2,6,7).

Concomitante com a produção exacerbada dos mediadores inflamatórios, as alterações hematológicas também foram observadas nos casos graves da COVID-19, e contribuíram como potenciais candidatos a biomarcadores prognósticos (8). Em relação as alterações leucocitárias em uma fase inicial da doença e nos indivíduos com sintomas leves, essas células não apresentam alterações na contagem ou quando apresentam, apenas uma discreta redução. Já em pacientes graves foi observado uma redução significativa, caracterizando a leucopenia presente em 28% a 68% dos acometidos de forma grave pela COVID-19 (9). No entanto, alguns estudos apontam, a contagem aumentada destas dos leucócitos totais, sendo a leucocitose associada ao maior risco de morte (10,11). Essa alteração pode ser compreendida pelo aumento da contagem de neutrófilos, que está mais pronunciada em pacientes que evoluíram ao óbito (10,12). Há diminuição no número

de linfócitos nos pacientes graves com COVID-19. A literatura se dedica em explicar esse evento (linfopenia) causada pelo vírus SARS-CoV-2 devido tanto pela invasão direta do vírus nos linfócitos, levando à morte celular, quanto pela atrofia dos órgãos linfoides secundários devido à atuação intensa de IL-4, IL-6 e IL-10. Essa atrofia interrompe a renovação de linfócitos, com diminuição significativa nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+, alterações observadas em pacientes internados em UTI. Por todos esses motivos entende-se que a linfopenia é um fator de prognóstico negativo para pacientes internados pela COVID-19 (12–14). Em relação as plaquetas, o achado mais comum na COVID-19 é a plaquetopenia que foi relacionada com a gravidade da doença (15,16). Um achado importante é a diminuição seriada na contagem de plaquetas durante a internação, que foi associada a maior mortalidade, da mesma forma que, a melhora neste quadro evidencia melhora clínica e maior sobrevida (17–19).

Desta forma torna se evidente a importância de estudar a relação dos parâmetros hematológicos com variáveis relacionadas ao agravamento da COVID-19, já que a literatura mostrou até o presente momento, estudos isolados dos padrões hematológicos e das dosagens das citocinas, mas ainda não evidenciou essa relação.

2. JUSTIFICATIVA

Mesmo com o avanço da vacinação e com o retorno da presencialidade nas atividades do dia a dia, a convivência com o SARS-CoV-2 ainda é ativa. Portanto, identificar correlações que demonstrem as alterações hematológicas e a associação com os biomarcadores inflamatórios como fator de risco na COVID-19 grave, é crucial para ajudar a identificar casos com pior prognóstico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Corona Vírus

O corona vírus foi descrito pela primeira vez em 1937, mas somente em 1965 recebeu o nome de coronavírus por apresentar um perfil microscópico semelhante a uma coroa. Em 2002, na China, foi identificado como o agente causador da síndrome respiratória aguda grave (SARSCoV) e em 2012, como o responsável pela síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi descoberto um novo corona vírus (SARS-CoV-2), responsável pela síndrome respiratória aguda grave, causador da doença COVID-19 (Figura 1).

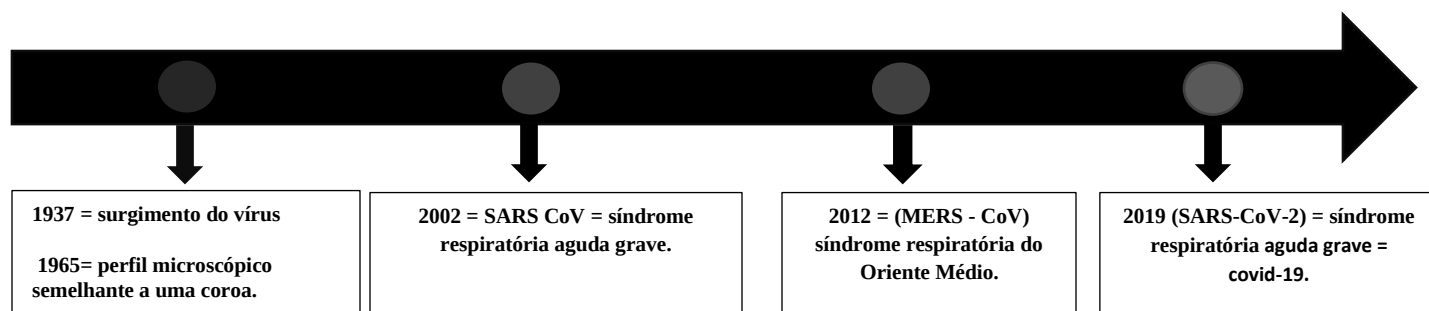


Figura 1- Contextualização do Histórico do Corona vírus. **Fonte: Os autores**

O novo tipo de corona vírus, membro da família de betacoronavírus, constituído por uma fita simples de RNA, com proteínas estruturais típicas, sendo elas; as proteínas do envelope (proteína E), proteína de membrana (proteína M), nucleocapsídeo (proteína N) e ainda, a espícula ou do inglês *Spike* (proteína S) (1,2,20–22) (Figura 2).

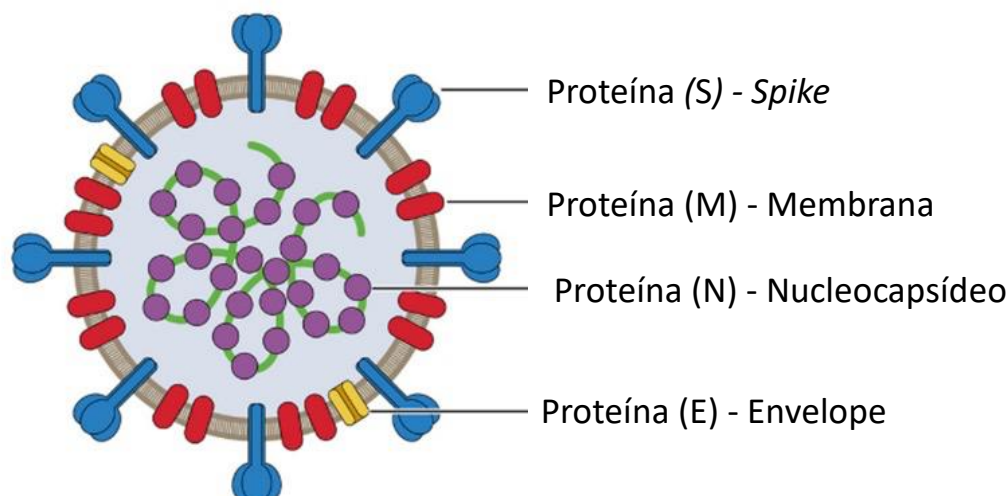


Figura 2 - Estrutura do coronavírus com RNA de fita simples, com nucleocapsídeo composto de RNA genômico e proteína do nucleocapsídeo fosforilado (N), a proteína da membrana (M), uma glicoproteína transmembrana do tipo III, e a proteína do envelope (E), que estão localizadas entre as proteínas S na membrana viral. **Fonte: Adaptado de de Synowiec et al 2021.**

A proteína *spike* (S) é uma glicoproteína que permite a entrada do vírus na célula hospedeira através da ligação ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em humanos, facilitando a entrada no citoplasma celular e a replicação viral. A replicação viral é regulada pela proteína N (23–26).

3.2 Pandemia, Sinais e Sintomas

A partir de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como pandemia. Até março de 2023, a OMS registrou 758.390.564 casos confirmados e 6.859.093 mortes em todo o mundo, enquanto o Brasil contabilizou 37.066.791 casos confirmados e 699.243 mortes (27,28). A infecção pode se apresentar em três principais condições clínicas: portadores assintomáticos, indivíduos com doença respiratória aguda (DRA) ou pacientes com pneumonia em diferentes graus de gravidade (29). Os principais sintomas incluem febre (88,3%), tosse (68,6%), mialgia ou fadiga (35,8%), expectoração (23,2%), dispneia (21,9%), cefaleia ou tontura (12,1%), diarreia (4,8%) e vômitos ou náuseas (3,9%) (30). Os sintomas mais graves estão relacionados

com hipoxemia, e quando há complicações dos sintomas citados acima, pode ocorrer internação em unidade de terapia intensiva (UTI) (31). De acordo com o Ministério da Saúde, cerca de 80% dos infectados apresentam doença leve, 14% apresentam doença grave e 5% são casos críticos (32). Os casos críticos estão associados com altas taxas de mortalidade e com grupos de risco, como idosos (mais de 60 anos de idade), obesidade, gestantes e pessoas com comorbidades variadas, como hipertensão, câncer, doença cardiovascular prévia, diabetes e doença respiratória crônica (33,34). Em relação aos menores de 18 anos, a doença apresenta-se de forma relativamente leve, com aproximadamente 2,4% do total de casos notificados, além disso, uma proporção muito pequena desenvolveu a forma grave da doença (2,5%) e uma proporção ainda menor desenvolveu a forma crítica (0,2%) (35).

3.3 Transmissão

Os coronavírus são parasitas intracelulares que não possuem metabolismo próprio e requerem células hospedeiras para se replicar (36). A entrada do vírus nas células hospedeiras ocorre por meio da ligação com receptores específicos presentes na superfície dessas células. No caso do SARS-CoV-2, o principal receptor é a proteína ECA2, que está presente em células epiteliais da cavidade nasal, faringe e alvéolos pulmonares, além de outros órgãos como intestino, coração, rins, olhos, cérebro, fígado e testículos (1,37). Sendo assim, a infecção por COVID-19 começa com a aspiração de gotículas exaladas por pacientes contaminados. O vírus SARS-CoV-2 atravessa o epitélio da laringe e/ou nasal e chega aos pulmões, onde as proteínas S na superfície do vírus se ligam aos receptores ECA2 presentes nas células, transferindo seu material genético para dentro da célula e iniciando seu processo de replicação (38–40) (Figura 3).

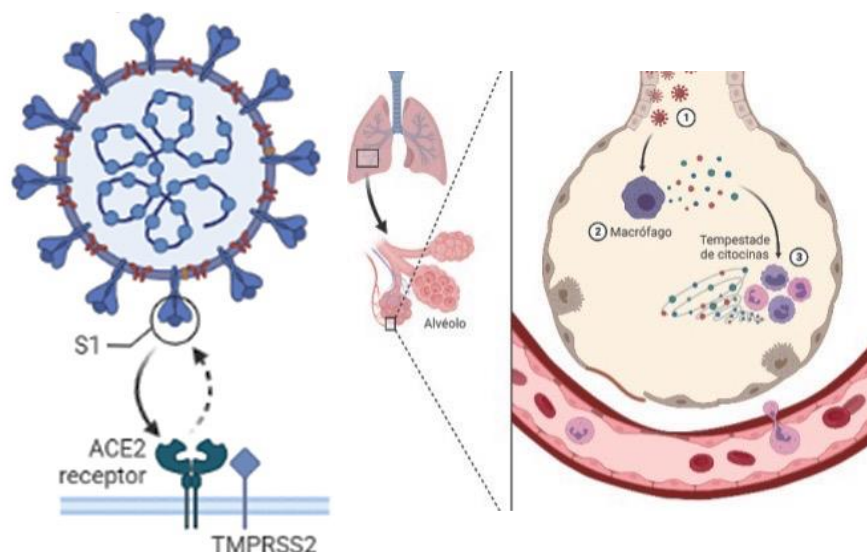


Figura 3- Chegada do vírus ao epitélio alveolar, ligação da proteína S ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), início do processo de replicação viral na célula hospedeira. Reatividade do sistema imune do hospedeiro com ativação de macrófagos alveolares e liberação de mediadores inflamatórios. Esses mediadores quando secretados de forma contínua formam a chamada Tempestade de Citocinas. **Fonte:** Adaptado de Gupta et al. 2020; Biorender, 2023.

Diversos estudos descreveram minuciosamente os processos bioquímicos envolvidos na infecção pelo SARS-CoV-2. Os resultados dessas investigações têm comprovado que a proteína S é fundamental para a ligação do vírus aos receptores celulares, sendo clivada por proteases celulares em sítios específicos, resultando na formação das subunidades S1 e S2. A furina, uma protease abundante nos pulmões, está envolvida nessa clivagem, e o sítio de ação da furina é encontrado somente na proteína S do SARS-CoV-2, o que pode explicar a maior infectividade e transmissibilidade desse vírus (41–43).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, ocorre um complexo processo bioquímico, envolvendo a transcrição reversa, tradução e replicação do genoma viral. Esse processo resulta na montagem, maturação e liberação das novas partículas virais, que dependem de um sistema enzimático complexo, tanto do vírus quanto da célula hospedeira. Algumas enzimas estão ausentes ou raramente encontradas em outros coronavírus (44). A infecção pelo SARS-CoV-2 pode resultar

na liberação de citocinas em resposta à infecção, o que pode levar a manifestações clínicas leves ou graves da doença (45).

3.4 Manifestações clínicas relacionadas a ativação do sistema imune

É sabido que as citocinas são produzidas tanto na fase inicial durante a ativação da resposta imune inata, bem como na fase efetora da imunidade adaptativa para mediar e regular a resposta inflamatória contra o invasor. Porém, na infecção por SARS-CoV-2 uma liberação aumentada de citocinas por células inflamatórias foi observado, sendo essa condição caracterizada pela “tempestade de citocinas” e, considerada uma das principais causas do agravamento da doença e morte em pacientes COVID-19 (46,47). Este termo tornou-se popular durante a pandemia, tanto para a população em geral quanto em publicações científicas, apesar de ter sido utilizado para outras doenças infecciosas e não infecciosas anteriormente à pandemia por COVID-19 (48).

Esta condição na COVID-19 pode ser evidenciada pela presença aumentada de interleucinas como IL-6, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP1 α), MIP1 β e MCP1, que atraem células do sistema imune, principalmente monócitos, macrófagos e células T para o foco de inflamação. Na presença de outras citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , monócitos e macrófagos promovem por feedback positivo acentuando a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e assim, gerando um ciclo na manutenção do estímulo à produção desses mediadores inflamatórios. O sistema imune permanece ativado e promove dano a estrutura pulmonar, além de causar danos em vários órgãos, como o coração e os rins. Estudos sugerem uma correlação direta entre a tempestade de citocinas e lesão pulmonar, falência de múltiplos órgãos e prognóstico desfavorável (47,49). Além disso, os anticorpos não neutralizantes, produzidos pelas células B, podem aumentar a infecção por SARS-CoV-2, exacerbando ainda mais os danos aos órgãos (50).

Estudos ainda mostraram níveis plasmáticos elevados de IL-2, IL-7, IL-10, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), IP-10, MCP1, MIP1 α e fator de necrose tumoral (TNF) em pacientes graves internados em UTI com COVID-19. Ainda, os níveis de IL-6 nesses pacientes continuam a aumentar ao longo do tempo e são relativamente mais elevados nos indivíduos que evoluíram a óbito do que nos sobreviventes (51).

Além disso, pacientes graves apresentam número maior de monócitos inflamatórios CD14⁺/CD16⁺ no sangue periférico, quando comparados com pacientes não graves (52,53). Os macrófagos inflamatórios secretam ainda mais citocinas inflamatórias, que contribuem para a tempestade de citocinas, incluindo MCP1, IP-10 e MIP1 α (54). Outro fator importante é que o aumento combinado (sinergia) entre IFN- γ e TNF α induz a morte celular, contribuindo para a gravidade da doença. Esta informação foi resultado de um estudo onde foram testadas 28 combinações entre citocinas e a combinação entre IFN- γ e TNF α foi a que demonstrou maior relação com morte celular em grande extensão (55). Pesquisas apontaram o momento da liberação do IFN- γ e TNF α durante a inflamação da COVID-19, e demonstraram que o momento de maior liberação do IFN- γ foi em casos moderado de COVID-19, já em relação ao TNF- α também foi observado a liberação aumentada em pacientes no estado moderado, mas seu pico de liberação foi em pacientes graves (55,56).

Estudos mostraram ainda que os níveis de IL-6 e IL-10 foram mais elevados nos pacientes com COVID-19 grave, sugerindo a necessidade da dosagem dos níveis séricos de IL-6 e IL-10, já que níveis aumentados podem ser considerados agravadores da doença (57). Em outra pesquisa, também mostrou que a dosagem de IL-6 pode ser considerada uma ferramenta de avaliação prognóstica da doença e, ainda, pode servir como preditor do agravamento, já que ao relacionar os níveis de IL-6 e da proteína C reativa (PCR) nos pacientes internados com COVID-19, ambos

estavam elevados. No entanto, nos pacientes que evoluíram a óbito as dosagens séricas de IL-6 foram mais expressivas quando comparado com PCR (57,58).

Assim, a resposta inflamatória excessiva ao SARS-CoV-2 é considerada uma das causas de gravidade da doença e morte em pacientes com COVID-19 (30), associada a altos níveis de citocinas circulantes, bem como com uma linfopenia profunda e trombocitopenia, com infiltração substancial de monócitos nos pulmões, coração (31), nódulos linfáticos do baço e rins (32,33), conforme observado na análise post-mortem. Recentemente, um estudo revelou os valores de hemograma no momento da admissão de 69 pacientes com COVID-19. Este estudo evidenciou que na admissão, 19 pacientes apresentavam leucopenia, sendo que apenas 1 apresentava leucopenia grave. Dos pacientes incluídos no estudo, 24 apresentaram linfopenia, sendo que 19 apresentavam de forma moderada e 5 apresentavam linfopenia grave. Em relação as plaquetas, apenas 13 pacientes apresentavam uma ligeira trombocitopenia (59).

De modo geral, pacientes infectados que tiveram transferência para UTI, apresentaram queda dos valores de hemoglobina, monócitos e estavam com contagens linfocitárias inferiores aos demais (mediana de $400/\text{mm}^3$ UTI x $1.200/\text{mm}^3$ não UTI), sendo considerado linfopenia $<600/\text{mm}^3$ um indicador para admissão precoce na UTI. Desta forma, tornou-se evidente a linfopenia como um fator de mau prognóstico, sendo correlacionada com aumento da PCR e níveis séricos de TNF, IL-6 e IL-10 (50). Além disso, a linfopenia foi uma característica frequente em pacientes que morreram da doença (51,60,61). Estudo realizado através de levantamento de dados em 7942 pacientes com SARS-CoV-2, mostrou a linfopenia presente na maioria dos casos considerados moderados e graves, sendo mais pronunciada quando associada ao menor nível de hemoglobina e menor número de neutrófilos (62).

A linfopenia também foi demonstrada em um estudo que revelou que entre 67% e 90% dos pacientes considerados graves apresentaram linfócitos diminuídos. No entanto, este mesmo estudo mostrou a leucocitose associada com neutrofilia, e esses valores foram associados como um marcador de pior prognóstico da doença (63,64). Os resultados de exames laboratoriais, além de demonstrarem uma diminuição no número total de linfócitos, também demonstraram uma diminuição nas subpopulações de células T CD4 e CD8, células B e NK, em casos moderado da COVID-19. Já em casos mais graves da doença, os linfócitos totais se expressam em valores ainda mais baixos, assim como as células T CD4, CD8 e células B (65). Essa diminuição do número total de linfócitos não é bem compreendida, mas há indicações de que o vírus compromete a função imune celular, já que pode ocorrer uma infecção direta do SARS-CoV-2 a estas células promovendo sua lise. Além disso, a tempestade de citocinas também pode promover a apoptose linfocitária, a atrofia dos órgãos linfóides, incluindo o baço, o que pode prejudicar ainda mais a ativação dos linfócitos (66–69).

Durante a fase crítica da doença e internação em UTI foi observado a neutropenia. Apesar de ser um parâmetro pouco relatado na literatura, sua demonstração está relacionada com outras infecções bacterianas, além do vírus SARS-CoV-2 e maior risco de morte (2,16,59,70). A eosinopenia também tem sido avaliada como um parâmetro diagnóstico com capacidade preditiva e discriminatória. Pacientes com COVID-19 apresentaram eosinopenia com sensibilidade de 74,7% e especificidade de 68,7%, curva ROC de 0,717, e a combinação de eosinopenia e aumento da proteína C reativa ultrassensível (us-PCR) apresentou sensibilidade de 67,9% e especificidade de 78,2% (ROC de 0,730) (22).

Juntamente a esse evento, também pode ocorrer a trombocitopenia, uma vez que as plaquetas participam ativamente da resposta imune e desempenham papel importante na hemostasia,

coagulação e resposta inflamatória. Alterações no seu número e funcionamento estão relacionados a uma grande variedade de doenças, entre elas complicações na COVID-19. Um estudo mostrou que no momento da admissão, a maioria dos pacientes com COVID-19 que apresentaram linfopenia e trombocitopenia, evoluíram para o estado grave da doença (71). A trombocitopenia nestes casos, pode ser compreendida pelo fato do vírus invadir diretamente células da medula óssea e inibir a produção hematopoiética. Ainda, o dano pulmonar causado pela infecção do SARS-Cov-2 pode comprometer os megacariócitos (células que produzem plaquetas) pulmonares e comprometer a liberação de plaquetas, levando assim a trombocitopenia (72,73). A trombocitopenia também foi associada a um maior risco (5 vezes) de se desenvolver formas graves da COVID-19 (74).

Diante do exposto, ressalta-se que a COVID-19 apresenta manifestações no sistema hematológico que se associam principalmente a leucopenia, linfopenia e plaquetopenia. Essa imunodepressão tem grande impacto no sistema imunológico e parece estar relacionado com o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Correlacionar as alterações hematológicas com variáveis clínicas e inflamatórias em pacientes internados com COVID-19 grave.

4.2 Objetivos específicos

- a) Identificar as alterações hematológicas em pacientes com COVID-19 hospitalizados.
- b) Correlacionar as alterações hematológicas com características clínicas dos pacientes.
- c) Correlacionar as alterações hematológicas com os níveis de citocinas em COVID-19.
- d) Correlacionar as alterações hematológicas com o desfecho óbito.

5. HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é que indivíduos internados com COVID-19 possuem alterações hematológicas, como leucopenia, linfopenia e plaquetopenia e estão correlacionadas com os níveis de citocinas, com aumento do risco de morte.

6. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob CONEP número: 3.944.734. O estudo foi realizado no Hospital Marcelino Champagnat (HMC) localizado em Curitiba, Paraná, no período de abril de 2020 a agosto de 2021. Os dados clínicos foram adquiridos dos prontuários dos pacientes incluídos no estudo, bem como, os dados laboratoriais (hemograma completo). Estes dados foram de prontuários digitais do programa computacional, Tasy® (Phillips Healthcare) no momento da admissão hospitalar. Dentre as variáveis utilizadas neste estudo, os valores obtidos no hemograma no momento da admissão foi o indicador para a separação dos pacientes quanto a presença ou não presença de alterações hematológicas. Os valores de referência utilizados seguiram os padrões laboratoriais utilizados pelo hospital HMC, sendo leucócitos totais (3600 a $12000/\text{mm}^3$); linfócitos totais (720 a $5040/\text{mm}^3$) e plaquetas totais (150.000 a $450.000/\text{mm}^3$).

6.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos indivíduos com idade acima de 18 anos, com testes imunológicos ou moleculares positivo para SARS-CoV-2. Estes consentiram a participação do estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

6.2 Critérios de Exclusão

Pacientes com diagnóstico de outras infecções virais, pacientes que usaram tocilizumab e pacientes imunodeprimidos (HIV + ou drogas imunossupressoras) foram excluídos do estudo (Figura 4).

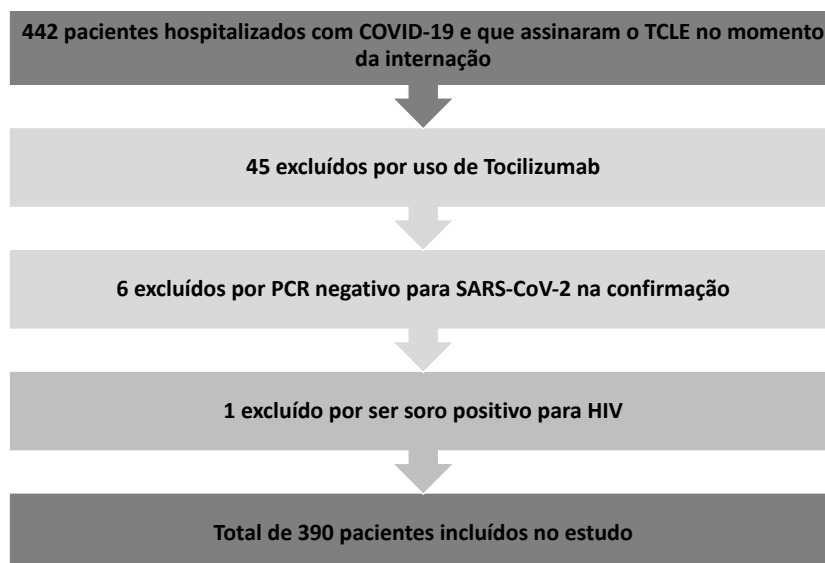


Figura 4 - Fluxograma dos participantes do estudo. **Fonte:** Os autores

6.3 Coleta e armazenamento das Amostras

Os pacientes incluídos no estudo, entraram em uma sequência de coleta de sangue com intervalos de 3 dias até o desfecho alta hospitalar ou óbito. O sangue periférico foi coletado em tubos SSTII para obtenção do soro. As amostras foram centrifugadas por 15 min em 1500 rpm, em seguida o soro foi aliquoteado e armazenados em freezer a -80°C. Para o presente estudo, somente a coleta na admissão foi utilizado para a dosagem de citocinas (Figura 5).

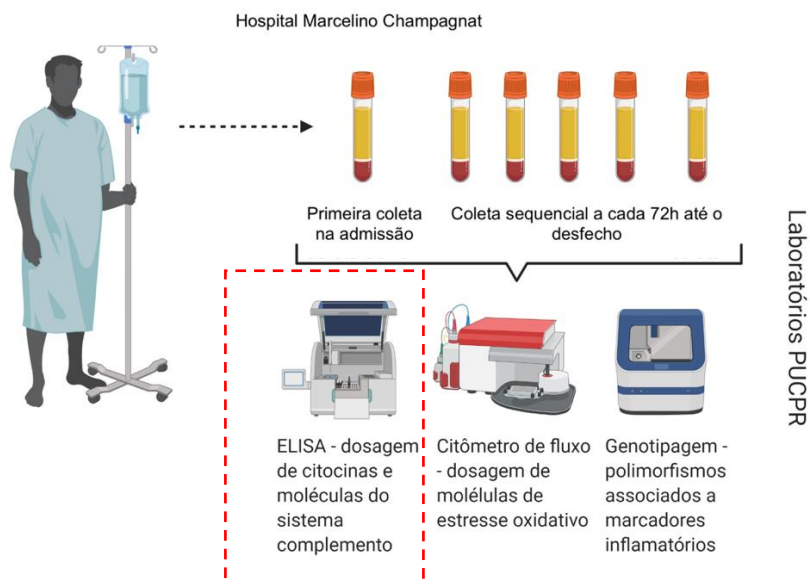


Figura 5 – Coleta e armazenamento das amostras no hospital Marcelino Champagnat. As amostras foram encaminhadas ao LabAIRE para separação de soro, plasma e células. As amostras biológicas foram utilizadas por diversos projetos relacionados à COVID-19 da PUCPR. Em destaque, o método utilizado no presente estudo. **Fonte:** Os autores

6.4 Dosagem das Citocinas

As dosagens das citocinas IL-6, IL-10, IL-4, IL-15, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ foram realizadas pelo método ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando kits comerciais (Immunotools, Friesoythe/Germany) de acordo com instruções do fabricante. As placas foram lidas no leitor de microplaca a 450 nm (Microplate Reader Versamax).

6.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.28.0. Para a descrição de variáveis quantitativas foram apresentados médias, desvios padrões, medianas e intervalo interquartil. Variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e percentuais. Para a comparação das classificações de leucócitos (normal, leucopenia ou leucocitose), de linfócitos (normal ou linfopenia) e de plaquetas (normal ou plaquetopenia), em

relação à idade e ao IMC, foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator ou o teste t de Student para amostras independentes. Para a análise da associação destas variáveis hematológicas com a expressão das citocinas, foram ajustados modelos de regressão linear. A associação com o desfecho de óbito intra-hospitalar foi avaliada ajustando-se modelos de Regressão Logística e usando-se o teste de wald. A medida de associação estimada foi a *odds ratio* (OR) com intervalos de confiança de 95%. Em todos os modelos a idade foi incluída como covariável. Para analisar o efeito conjunto da expressão de cada citocina e cada marcador hematológico sobre a probabilidade de óbito foram ajustados modelos de regressão logística incluindo a expressão da citocina, o termo quadrático da citocina, o marcador hematológico e a idade como variáveis explicativas. A partir do ajuste desses modelos foram estimadas as probabilidades de óbito de acordo com intervalos e das citocinas. As probabilidades, bem como seus intervalos de confiança de 95%, foram apresentadas em gráficos de linhas, através do programa Stata® 18. A condição de normalidade de variáveis quantitativas contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em todas as análises os dados da expressão de citocinas foram previamente submetidos a uma transformação logarítmica. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

7. RESULTADOS

7.1 Características clínicas e demográficas da população estudada

Este estudo contou com a participação de 390 pacientes. A Tabela 1 apresenta os dados das variáveis demográficas e clínicas basais no momento da admissão hospitalar. A média de idade da amostra foi de $54,6 \pm 16,4$, sendo 26,9% com idade superior a 65 anos.

TABELA 1 - Características da população de estudo na admissão

Variável	n	Resultado
Idade (anos) (média $\pm$ DP)	390	$54,6 \pm 16,4$
Idade ≥ 65 anos	390	26,9%
Sexo masculino	390	62,3%
IMC (kg/m^2) (média $\pm$ DP)	342	$29,9 \pm 4,9$
IMC $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$	358	45,9%
Disfunções cárdio-metabólica*	383	52,2%
Asma	388	5,4%
DPOC	389	3,1%
Saturação % (média $\pm$ DP)	389	$91,6 \pm 5,3$
Saturação na admissão $< 95\%$	389	33,9%

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou porcentagem.

*Legenda: Disfunções cárdio-metabólica compreende: Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes melitus (DM), Insuficiência cardíaca, Síndrome coronariana crônica, Infarto agudo do miocárdio (IAM), Acidente vascular encefálico, Doença arterial periférica, Dislipidemia.

7.2 Classificação dos parâmetros hematológicos na amostra

Os resultados demonstram que uma parcela da amostra revelou ser linfopênica (34,3%) e plaquetopênica (26,2%). Por outro lado, uma pequena proporção dos pacientes do estudo apresentava leucopenia (4,1%), enquanto 17,3% da população apresentou leucocitose (Tabela 2).

TABELA 2 – Variáveis relativas aos Parâmetros Hematológicos

Variável	Classificação	n	%
Leucócitos totais	Normal	305	78,6%
	Leucopenia	16	4,1%
	Leucocitose	67	17,3%
*Linfócitos totais	Normal	253	65,7%
	Linfopenia	132	34,3%
**Plaquetas totais	Normal	284	73,8%
	Plaquetopenia	101	26,2%

*Excluídos 2 casos com classificação linfocitose, **Excluídos 4 casos com classificação plaquetocitose.

Os dados são apresentados como porcentagem.

7.3 Avaliação da associação de parâmetros hematológicos com a idade e IMC.

Uma vez que a idade (Kittu et al.⁽⁷⁵⁾) e o IMC (Singh et al.⁽⁷⁶⁾) foram observados como preditores de mortalidade na infecção por SARS-CoV-2, utilizamos essas variáveis para a análise de associação com os parâmetros hematológicos. Na comparação entre normalidade do número total de leucócitos, linfócitos ou plaquetas, nenhuma alteração no perfil hematológico foi significativa em relação a idade e IMC no momento da internação (Tabela 3).

TABELA 3 – Comparação das Alterações Hematológicas com a idade e IMC

Variável	Leucócitos	n	Média ± desvio padrão	P*
Idade (anos)	Normal	305	53,8±16,1	0,065
	Leucopenia	16	51,6±18,2	
	Leucocitose	67	58,7±17,0	
IMC (kg/m ²)	Normal	270	30,1±4,9	0,193
	Leucopenia	15	28,3±4,6	
	Leucocitose	55	29,2±4,6	
Variáveis	Linfócitos	n	Média ± desvio padrão	p*
Idade (anos)	Normal	253	53,5±15,8	0,089
	Linfopenia	132	56,6±17,4	
IMC (kg/m ²)	Normal	223	30,1±4,9	0,159
	Linfopenia	115	29,3±4,6	
Variáveis	Plaquetas	n	Média ± desvio padrão	p*
Idade (anos)	Normal	284	54,5±16,3	0,761
	Plaquetopenia	101	55,0±17,1	
IMC (kg/m ²)	Normal	246	30,1±4,8	0,317
	Plaquetopenia	92	29,5±4,9	

*Teste t de Student para amostras independentes, p<0,05

7.4 Avaliação da associação de parâmetros hematológicos com os níveis de citocinas.

Em relação a análise de associação entre o número de leucócitos e os níveis de citocinas em um modelo de regressão linear ajustando os dados para idade e IMC, observa-se que a

leucocitose foi significativa com os níveis de IL-1 β no momento da internação (Tabela 4), enquanto a leucopenia teve correlação com a IL-10 (Tabela 4).

TABELA 4 – Comparação dos Parâmetros Leucocitários com as Citocinas

Variável	Leucócitos	n	Mediana (min-max)	p*
TNF- α	Normal	263	7,6 (1,7 - 75,6)	
	Leucopenia	15	11,8 (3,4 - 71,5)	0,127
	Leucocitose	57	10,4 (2,1 - 81,6)	0,086
IL-1 β	Normal	248	8,3 (2,5 - 41,3)	
	Leucopenia	15	8,7 (6,1 - 35,4)	0,646
	Leucocitose	54	10,3 (5,9 - 51,1)	0,006**
IL-6	Normal	263	10,8 (2 - 99,5)	
	Leucopenia	15	11,8 (3,7 - 75)	0,756
	Leucocitose	56	11,1 (3,1 - 88,6)	0,280
IL-10	Normal	253	6,8 (1,9 - 66,2)	
	Leucopenia	14	8,1 (4,4 - 183,3)	0,006**
	Leucocitose	55	6,9 (3,2 - 74,3)	0,579
IFN- γ	Normal	262	6,9 (0,7 - 84,5)	
	Leucopenia	15	9,1 (2,7 - 33,2)	0,243
	Leucocitose	57	7,9 (3,2 - 75,4)	0,421
IL-4	Normal	261	6,5 (2,5 - 34,5)	
	Leucopenia	15	5,8 (3,9 - 25,4)	0,789
	Leucocitose	57	7,2 (3,4 - 48,2)	0,257
IL-15	Normal	253	7,1 (1,1 - 37,9)	
	Leucopenia	15	8,6 (3,3 - 20,2)	0,210
	Leucocitose	55	6,3 (1,7 - 31,3)	0,475

*Modelo de Regressão Linear ajustado para idade e após transformação logarítmica sobre as variáveis de citocinas, p<0,05

Na comparação da linfopenia com as citocinas, observa-se associação da linfopenia com IL-4, IL-6 e IFN- γ (Tabela 5), mesmo quando ajustado para a idade.

TABELA 5 – Comparação das classificações de Linfócitos em relação a citocinas

Variáveis	Linfócitos	n	Mediana (min-max)	p*
IL-4	Normal	218	6,2 (2,5 - 48,2)	
	Linfopenia	112	7,4 (2,8 - 30,9)	0,030*
IL-6	Normal	219	9,8 (2,2 - 99,5)	
	Linfopenia	113	14,0 (2,0 - 75)	0,021*
IFN- γ	Normal	218	6,6 (0,7 - 75,4)	
	Linfopenia	113	8,4 (2,5 - 84,5)	0,014*
IL-10	Normal	212	6,7 (2,7 - 183)	
	Linfopenia	107	6,8 (1,9 - 36,7)	0,585
TNF- α	Normal	219	7,6 (1,7 - 81,6)	
	Linfopenia	113	9,3 (1,9 - 71,5)	0,111
IL-15	Normal	212	7,1 (1,6 - 37,9)	

	Linfopenia	108	7,1 (1,1 - 34,6)	0,957
IL-1 β	Normal	208	8,6 (3,8 - 51,1)	
	Linfopenia	106	9,0 (2,5 - 41,3)	0,608

*Modelo de Regressão Linear ajustado para idade e após transformação logarítmica sobre as variáveis de citocinas, $p < 0,05$

Na comparação da plaquetopenia com as citocinas, observa-se associação com os níveis de IL-10 e INF- γ , mesmo quando ajustado com a idade biológica (Tabela 6).

TABELA 6 – Comparação do número de Plaquetas em relação as Citocinas

Variáveis	Plaquetas	n	Mediana (min-max)	p*
IL-10	Normal	236	6,3 (1,9 - 190)	
	Plaquetopenia	83	7,5 (3,0 - 183)	0,006*
INF- γ	Normal	245	6,8 (0,7 - 84,5)	
	Plaquetopenia	86	8,3 (2,6 - 69,7)	0,042*
IL-6	Normal	245	11,1 (2,1 - 99,5)	
	Plaquetopenia	86	11,2 (2,0 - 75)	0,552
IL-4	Normal	246	6,5 (2,5 - 48,2)	
	Plaquetopenia	84	6,8 (3,2 - 34,5)	0,563
TNF- α	Normal	246	7,6 (1,7 - 81,6)	
	Plaquetopenia	86	9,6 (2,2 - 71,5)	0,127
IL-15	Normal	238	7,1 (1,1 - 34,6)	
	Plaquetopenia	82	6,9 (1,6 - 37,9)	0,506
IL-1 β	Normal	235	8,9 (2,5 - 51,1)	
	Plaquetopenia	79	8,4 (4,4 - 35,4)	0,155

*Modelo de Regressão Linear ajustado para idade e após transformação logarítmica sobre as variáveis de citocinas, $p < 0,05$

7.5 Avaliação da associação das alterações hematológicas e o desfecho de óbito

Indivíduos linfopênicos possuem quase 3 vezes maior probabilidade de morte em relação aos indivíduos com número normal de linfócitos (Tabela 7). Nenhuma associação significativa foi encontrada com alterações nos números de leucócitos ou plaquetas (Tabela 7).

TABELA 7 – Associação dos Parâmetros Hematológicos com o Desfecho óbito

Variável	Classificação	Total	% Óbito	p*	OR (IC95%)
Leucócitos	Normal	305	40 (13,1%)		
	Leucopenia	16	3 (18,8%)	0,455	1,79 (0,39 – 8,19)
	Leucocitose	67	16 (23,9%)	0,195	1,63 (0,78 – 3,39)
Linfócitos	Normal	253	27 (10,7%)		
	Linfopenia	132	32 (24,2%)	0,006	2,42 (1,30 – 4,53)
Plaquetas	Normal	284	41 (14,4%)		
	Plaquetopenia	101	19 (18,8%)	0,398	1,33 (0,68 – 2,59)

*Modelo de Regressão Logística e teste de Wald, ajustado para idade, $p < 0,05$

7.6 Associação das alterações hematológicas e citocinas com a probabilidade de óbito

Para essa avaliação, modelos de regressão logística foram criados para estimar a probabilidade de óbito de acordo com as concentrações de cada citocina com as alterações hematológicas definidos pelos grupos de leucócitos totais (normal, leucopenia e leucocitose), linfócitos (normal e linfopenia) e plaquetas (normal e plaquetopenia).

Assim, a leucocitose anteriormente relacionada com os níveis de IL-1 β , juntas não tiveram relação com aumento da probabilidade de óbito ($p = 0,215$) (Figura 6-A). Da mesma forma, a leucopenia relacionada com os altos níveis de IL-10, não mostraram significância na probabilidade de óbito ($p = 0,862$) (Figura 6-B). Para as análises do modelo para as outras citocinas mensuradas no presente estudo, nenhuma associação conjunta com as variações no número de leucócitos totais com a probabilidade de óbito foi observada (Dados não mostrados).

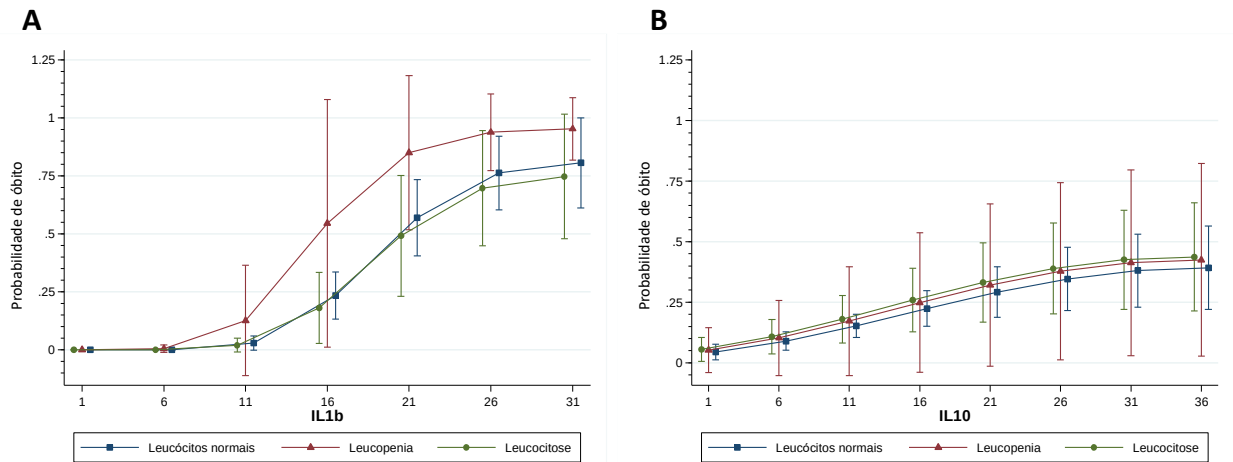


Figura 6 - Associação conjunta dos números de leucócitos quanto a classificação de normalidade, leucopenia e leucocitose e as citocinas (A) IL-1b e (B) IL-10 com a probabilidade de óbito. Análise realizada por Regressão Logística com termo quadrático das concentrações de citocinas e as alterações hematológicas como variáveis explicativas na probabilidade de morte.

A linfopenia e a IL-4 (Figura 7- A) em conjunto não possuem relação com aumento da probabilidade de óbito na população do estudo ($p=0,215$). Por outro lado, uma maior concentração de IL-6 em indivíduos linfopênicos ($p=0,002$) confere uma maior probabilidade de evolução para o desfecho óbito, principalmente para níveis mais altos que 26 pg/mL (Figura 7-B). Isso foi igualmente observado com a citocina IFN- γ (Figura 7-C), que em indivíduos linfopênicos aumentam a probabilidade de óbito ($p=0.019$) em concentrações maiores que 16 pg/mL.

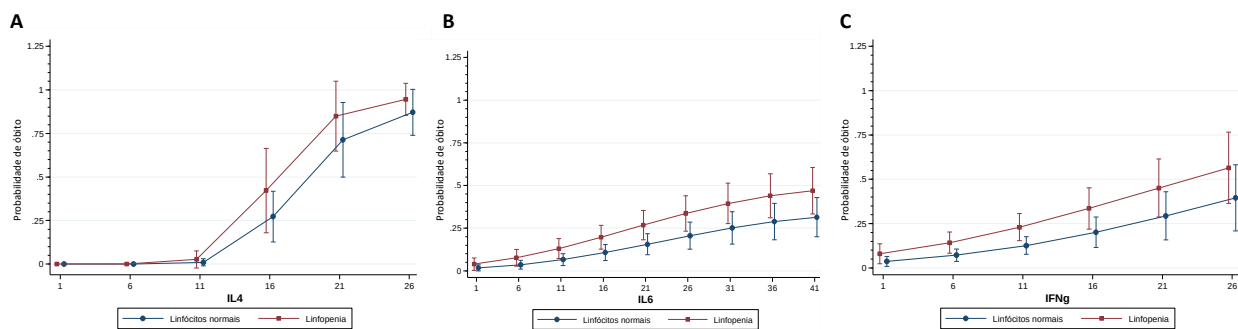


Figura 7 - Associação conjunta dos números de linfócitos quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas (A) IL-4, (B) IL-6 e (C) IFN- γ com a probabilidade de óbito. Análise realizada por Regressão Logística com termo quadrático das concentrações de citocinas e as alterações hematológicas como variáveis explicativas na probabilidade de morte.

Quando analisamos outras citocinas que não foram relacionadas com as mudanças nos números de linfócitos anteriormente, observamos que em indivíduos linfopênicos a probabilidade de óbito foi significativamente maior em concentrações maiores que 21 pg/mL para TNF- α ($p=0,049$) (Figura 8-A), 11 pg/mL para IL-15 ($p=0.002$) (Figura 8-B), 16 pg/mL para IL-1 β ($p=0,002$) (Figura 8-C) e 11 pg/mL para IL-10 ($p=0,004$) (Figura 8-D).

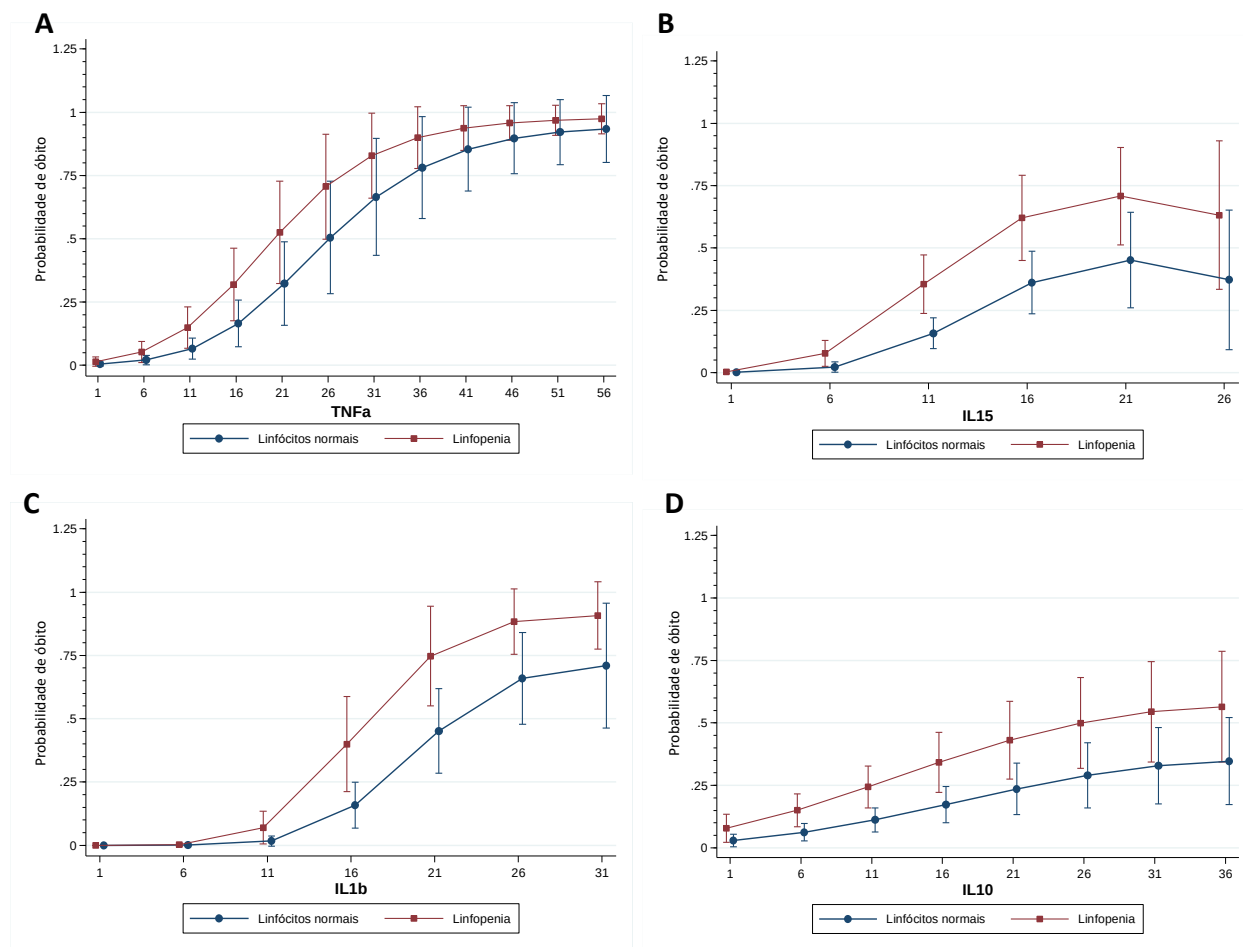


Figura 8 - Associação conjunta dos números de linfócitos quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas (A) TNF- α , (B) IL-15 (C) IL-1 β e (D) IL-10 com a probabilidade de óbito. Análise realizada por Regressão Logística com termo quadrático das concentrações de citocinas e as alterações hematológicas como variáveis explicativas na probabilidade de morte.

Ambas as citocinas que tiveram correlação positiva com a plaquetopenia, IL-10 e IFN- γ , quando analisadas em conjunto, não mostraram relação com o aumento na probabilidade de óbito

($p=0,831$ e $p=0,651$, Figura 9 – A e B, respectivamente) na população em estudo. Entretanto, ao avaliar o efeito dos níveis de IL-1 β ajustado para as alterações no número de plaquetas, foi possível observar aumento na probabilidade de óbito (0,044) a partir de 16 pg/mL.

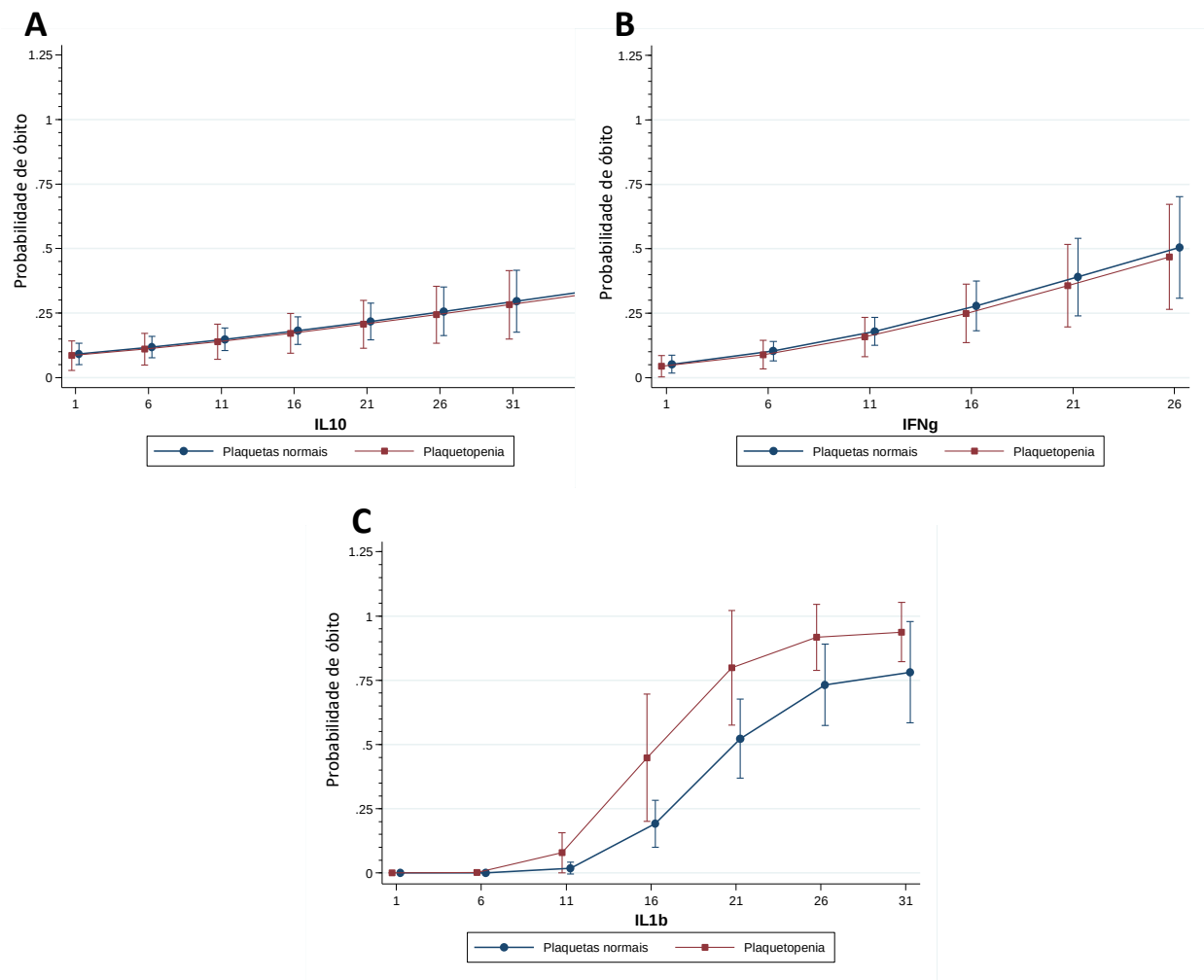


Figura 9 - Associação conjunta dos números de plaquetas quanto a classificação de normalidade e linfopenia e as citocinas (A) IL-10, (B) IFN- γ e (C) IL-1 β com a probabilidade de óbito. Análise realizada por Regressão Logística com termo quadrático das concentrações de citocinas e as alterações hematológicas como variáveis explicativas na probabilidade de morte.

8. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados revelam que o risco de morte para pacientes internados com COVID-19 com linfopenia foi 3 vezes maior, com correlação positiva com níveis aumentados de IL-4, IL-6 e IFN- γ , mas sem relação com a idade ou IMC na população estudada. Na análise conjunta entre alterações hematológicas e citocinas na probabilidade de morte, os resultados demonstram relação positiva entre a linfopenia e vários dos mediadores inflamatórios mensurados (IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-1 β e IL-10) com o aumento da probabilidade de óbito. Juntos, os resultados sugerem que parâmetros hematológicos alterados possam ser preditores para a evolução da COVID-19 grave à morte. Contando no momento com a pandemia neutralizada e grande parte da população brasileira vacinada, nossos resultados são importantes para aqueles que, por alguma razão, quando infectados pelo SARS-CoV-2 evoluam para um quadro grave da doença. A avaliação longitudinal da contagem de linfócitos pode ajudar a identificar casos com pior prognóstico, induzindo a pronta intervenção para a melhor evolução dos pacientes, e mesmo, a recuperação desses pacientes. Ainda, as alterações hematológicas, principalmente a linfopenia, observadas no presente trabalho, podem ser explicadas como uma consequência da produção intensa de mediadores inflamatórios.

A linfopenia já foi relacionada ao óbito. De 35% a 75% dos pacientes que desenvolveram linfopenia durante o período de internação por COVID-19, foram a óbito (74). Nossos resultados corroboram com os achados da literatura, em que 34,3% dos pacientes internados com COVID-19 apresentaram linfopenia. A literatura interpreta esse achado como um possível aumento de morte por lise de linfócitos por infecção direta do SARS-Cov-2, já que os linfócitos apresentam a expressão do receptor ECA2 (70). No curso inicial da doença, onde os sintomas ainda são inespecíficos, a contagem de linfócitos e leucócitos está dentro da normalidade com discreta

diminuição. Com a avançar da doença e com sintomas mais pronunciados e com a liberação de mediadores inflamatórios, a linfopenia se torna mais evidente (77). Um estudo na China com 90 pacientes mostrou que, entre os dias 10-12 do início dos sintomas, a contagem de leucócitos estava diminuída, o que sinalizava uma doença pré-grave. Já entre os dias 17-19 do início dos sintomas a contagem de leucócitos, ainda mais diminuída, relacionava-se com uma fase crítica da doença (16).

Em um estudo comparando pacientes graves e não graves com COVID-19 foi constatado que 96% dos pacientes graves apresentaram linfopenia acentuada e cerca de 80% dos pacientes considerados não graves também apresentavam a diminuição dos linfócitos, mas menos acentuada como dos pacientes graves. Ainda, dados conjuntos de estudos indicaram a associação de internação em UTI e o desenvolvimento da Síndrome do Desconforto Respiratório (SRDA) com a diminuição de linfócitos (2,7,78).

Porém, dados conflitantes foram demonstrados, em uma comparação entre pacientes considerados graves que evoluíram ao óbito e que não evoluíram ao óbito, não houve diferença estatística em relação a linfopenia, ou seja, tanto os pacientes considerados graves que morreram quanto os que tiveram alta hospitalar apresentaram baixa contagem linfocitária (79). A linfopenia também foi proeminente entre pacientes gravemente enfermos com COVID-19 em Washington, EUA (80,81). Durante a hospitalização, os não sobreviventes demonstraram uma deterioração mais significativa na linfopenia em comparação com aqueles que sobreviveram (78). Também foi relatado que pacientes com doença grave e desfechos fatais apresentam diminuição da relação linfócitos/glóbulos brancos tanto na admissão quanto durante a hospitalização em comparação com aqueles que sobreviveram (82,83). Nossos resultados revelam que indivíduos linfopênicos apresentam 3 vezes maior risco de óbito e ainda. Ainda, ressalta que a probabilidade de óbito aumenta quanto analisada a relação conjunta da linfopenia e marcadores inflamatórios. Portanto,

indivíduos linfopênicos e com níveis de citocinas aumentados apresentaram maior risco de óbito, sugerindo que a contagem de linfócitos pode ser um importante indicador prognóstico na avaliação da evolução clínica da COVID-19. Diante dessas evidências, é importante destacar a relevância da avaliação da contagem de linfócitos em pacientes com COVID-19 grave, especialmente aqueles com fatores de risco para um curso mais grave da doença, como a idade avançada e doença cardíometabólica. Além disso, os resultados obtidos fornecem informações importantes sobre a fisiopatologia da COVID-19, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e prognósticas mais efetivas.

Descrições de dados laboratoriais do número total de leucócitos, por sua vez, indicam que no momento da admissão hospitalar, 33,7% dos pacientes apresentavam a leucopenia, não sendo relatado valores em relação a leucocitose (16). Terpos et al. (77) relatam que durante o período de incubação do SARS-Cov-2, variando de 1 a 14 dias, e durante a fase inicial da doença, quando sintomas inespecíficos estão presentes, a contagem de leucócitos no sangue periférico é normal ou discretamente reduzida. No decorrer da doença a leucopenia foi relacionada com o agravamento do caso clínico do paciente. Pacientes considerados graves (61,1%) apresentavam-se leucopênicos em comparação com pacientes considerados não graves (28,1%) (27). Em um estudo retrospectivo realizado com o intuito de verificar as alterações hematológicas durante a hospitalização foi constatado tanto a presença de leucopenia (68,4%) quanto de leucocitose (61,4%) (84). Nossos resultados revelam porcentagem mais baixas do que a da literatura quando avaliado o número total de leucócitos, em que 4,1% dos pacientes internados apresentaram leucopenia e 17,3% apresentaram leucocitose. Na análise conjunta com os mediadores inflamatórios, nenhuma correlação positiva foi encontrada quanto ao aumento do risco de óbito. Essa avaliação pode estar relacionada ao momento da análise do hemograma do paciente. Nossos resultados estão baseados

na primeira coleta após a internação, e não fizemos análise sequencial durante a internação, devido as dificuldades no manejo desses pacientes internados com COVID-19 grave.

Em uma metanálise foi demonstrado que a trombocitopenia está significativamente associada à gravidade da COVID-19, embora haja uma heterogeneidade muito alta entre os estudos, uma queda mais considerável na contagem de plaquetas foi notada especialmente em não sobreviventes. A trombocitopenia estava presente em 36,2% dos pacientes admitidos em UTI e em 46,6% dos pacientes com desfecho primário (admissão em UTI + ventilação mecânica ou morte), um dos estudos desta metanálise relatou que os casos graves apresentaram trombocitopenia mais frequente que os casos não graves e os pacientes que necessitaram de UTI apresentaram baixa contagem de plaquetas quando comparado aos pacientes que não necessitaram de UTI. Mas neste mesmo artigo, um outro estudo, revelou que não ocorreram diferenças significativas na contagem de plaquetas dos pacientes alocados em UTI quando comparados com os pacientes que não precisaram de UTI. Entre os pacientes que evoluíram para SDRA também não foi constatado nenhuma diferença significativa quando comparados com aqueles que não evoluíram para SDRA. O mesmo ocorreu em relação os pacientes que necessitaram de suplementação de oxigênio não houve diferença quando comparado com os que não necessitaram (2,7,16,80,81,83,85–87). No presente estudo observamos relação significativa do número de plaquetas em conjunto com IL-1 β no aumento do risco de óbito. Por ser um dado isolado, sua relevância biológica pode ser questionada e esse dado deve ser observado com cautela.

Assim, precisa-se destacar algumas limitações do presente estudo. Não foram analisados hemogramas sequenciais durante o internamento para avaliar modificações hematológicas outras que as encontradas no momento do internamento. Além disso, nem todos os possíveis fatores de confusão foram coletados, como infecção secundária e trauma ou hemorragia anterior a internação.

De qualquer modo, os resultados aqui apresentados fornecem novas perspectivas sobre o papel das citocinas no contexto das alterações hematológicas, principalmente a linfopenia e sua associação com a mortalidade. Essa informação em separado não é nova, mas nenhum outro trabalho que tenhamos observado na literatura, avaliou a correlação conjunta entre esses dois fatores altamente prevalentes na COVID-19 grave com a probabilidade de óbito. Desta forma, nosso trabalho agrega tanto informação sobre a fisiopatologia da doença em relação as alterações imunes, como também para o desenvolvimento de estratégias de tratamento mais eficazes e personalizadas.

9. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

1. A população estudada apresentou leucocitose, linfopenia e plaquetopenia;
2. Alterações hematológicas não foram relacionadas as variáveis idade e IMC;
3. Indivíduos que apresentaram leucocitose demonstraram correlação com o aumento de IL-1 β e a leucopenia com o aumento da IL-10. Porém não houve correlação entre essas variáveis e o aumento do risco de óbito;
4. Indivíduos que apresentaram linfopenia demonstraram correlação com o aumento de IL-6, IFN γ e IL4 e apresentaram quase três vezes mais chances de evoluírem a óbito.
5. Ainda, quando avaliado em conjunto, linfopenia e mediadores inflamatórios como IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-1 β e IL-10, foi observado relação positivo com maior probabilidade de morte.
6. Trombocitopenia teve relação com níveis aumentados de IL-10 e IFN- γ , sem exercerem juntas aumento na probabilidade de morte. Somente menor número de plaqueta com maiores níveis de IL-1 β foram relacionados com maior risco de morte.

10. REFERÊNCIAS

1. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10223):507–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
2. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk Factors Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients with Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020;180(7):934–43.
3. Jain V, Yuan JM. Predictive symptoms and comorbidities for severe COVID-19 and intensive care unit admission: a systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health* [Internet]. 2020;65(5):533–46. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00038-020-01390-7>
4. Tan E, Song J, Deane AM, Plummer MP. Global Impact of Coronavirus Disease 2019 Infection Requiring Admission to the ICU. *Chest*. 2021;159(2):524–36.
5. do Nascimento Antonio MV, L Imperador CH, Espreafico Junior CR, Man Chin C, Longhin Bosquesi P. Vista do Tempestade de citocinas na COVID-19. *ULAKES J Med* [Internet]. 2020;1:31–40. Available from: <http://revistas.unilago.edu.br/index.php/ulakes/article/view/255/234>
6. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017;39(5):529–39.
7. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
8. Paula HI de, Amorim DLAN, Gonzaga GM, Batista JS, Ferreira FSB, Xavier FD. Alterações Hematológicas Da Covid-19. *Brasília Médica*. 2021;58:1–6.
9. Karimi Shahri M, Niazkar HR, Rad F. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(2):160–8.
10. Allegra A, Di Gioacchino M, Tonacci A, Musolino C, Gangemi S. Immunopathology of SARS-CoV-2 infection: Immune cells and mediators, prognostic factors, and immune-therapeutic implications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):1–19.
11. Javanian M, Bayani M, Shokri M, Sadeghi-Haddad-Zavareh M, Babazadeh A, Yeganeh B, et al. Clinical and laboratory findings from patients with COVID-19 pneumonia in Babol North of Iran: a retrospective cohort study. *Rom J Intern Med*. 2020;58(3):161–7.
12. Rahman A, Niloofa R, Jayarajah U, De Mel S, Abeysuriya V, Seneviratne SL. Hematological abnormalities in COVID-19: A narrative review. *Am J Trop Med Hyg*. 2021;104(4):1188–201.
13. Yang M, Ng MHL, Li CK, Chan PKS, Liu C, Ye JY, et al. Thrombopoietin levels increased in patients with severe acute respiratory syndrome. *Thromb Res*. 2008;122(4):473–7.
14. García LF. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front Immunol*. 2020;11(June):4–8.
15. Lippi G, Plebani M, Michael B. Thrombocytopenia in severe Covid cases. *Clin Chim Acta*. 2020;506(January):145–8.
16. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus

- Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708–20.
17. Gallo Marin B, Aghagoli G, Lavine K, Yang L, Siff EJ, Chiang SS, et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. *Rev Med Virol*. 2021;31(1):1–10.
18. Wool GD, Miller JL. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology*. 2021;88(1):15–27.
19. Yang X, Yang Q, Wang Y, Wu Y, Xu J, Yu Y, et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18(6):1469–72.
20. Choudhury A MS. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J Med Virol* [Internet]. 2020;92(10):210. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25987> PMID:32383269. »
21. Saghazadeh A RN. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus: a perspective. *Expert Rev Clin Immunol*.
22. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424–32.
23. Uzunian A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. *J Bras Patol Med Lab* [Internet]. 2020;56:1–4. Available from: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/Hj6QN7mmmKC4Q9SNNt7xRh/?format=pdf&lang=pt>
24. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325–8.
25. Shukla AK, Banerjee M. Angiotensin-Converting-Enzyme 2 and Renin-Angiotensin System Inhibitors in COVID-19: An Update. *High Blood Press Cardiovasc Prev* [Internet]. 2021;28(2):129–39. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40292-021-00439-9>
26. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020;46(4):586–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
27. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
28. Boletim epidemiológico no. 5. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico – COE COVID-19. [Internet]. 13/03/2020. [cited 2020 Apr 7]. Available from: <https://www.saude.gov.br>
29. Lai CC, Liu YH, Wang CY, Wang YH, Hsueh SC, Yen MY, et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2020;53(3):404–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
30. Li L-Q, Huang T, Wang Y-Q et al. 2019 novel coronavirus patients clinical characteristics, discharge rate and fatality rate of meta-analysis.
31. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 . 2020.
32. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de

- Emergências em Saúde Pública. Doença pelo coronavírus 2019: ampliação da vigilância, medidas não farmacológicas e descentralização do diagnóstico laboratorial. Bol Epi. 2020.
33. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública. Especial: doença pelo coronavírus 2019. Bol Epidemiol [Internet]. [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://www.saude.gov.br>
 34. Jordan R, Adab P CK. Covid-19: risk factors for severe disease and death.
 35. De Oliveira Lima CMA. Information about the new coronavirus disease (COVID-19). Radiol Bras. 2020;53(2):v–vi.
 36. Franco BDG de M, Landgraf M, Pinto UM. Alimentos, Sars-CoV-2 e Covid-19: contato possível, transmissão improvável. Estud Avancados. 2020;34(100):189–202.
 37. Zhang Y, Ma Z. Impact of the COVID-19 pandemic on mental health and quality of life among local residents in Liaoning Province, China: A cross-sectional study. International Journal of Environmental Research and Public Health [revista en Internet] 2020 [acceso 8 de octu. Impact COVID-19 pandemic Ment Heal Qual life among local Resid Liaoning Prov China A cross-sectional study [Internet]. 2020;17(march):2381. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32233719/>
 38. Zhang P, Zhu L, Cai J et al. Association of inpatient use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin ii receptor blockers with mortality among patients with hypertension hospitalized with COVID-19.
 39. Lin L, Lu L, Cao W, Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):727–32.
 40. Xu YH, Dong JH, An WM, Lv XY, Yin XP, Zhang JZ, et al. Clinical and computed tomographic imaging features of novel coronavirus pneumonia caused by SARS-CoV-2. J Infect. 2020;80(4):394–400.
 41. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. Nature [Internet]. 2020;582(7811):289–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>
 42. Coutard B, Valle C, Lamballerie X De, Canard B, Seidah NG, Decroly E. VALLE, Coralie et al. Drugs against SARS-CoV-2: What do we know about their mode of action?. Reviews in medical virology, v. 30, n. 6, p. 1-10, 2020. 2020;(January).
 43. Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. 2020;2(March).
 44. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- research that is available on the COVID-19 resource centre - including this ScienceDirect Genotype and phenoty. 2020;(January).
 45. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. J Leukoc Biol. 2020;108(1):17–41.
 46. Ferrara JL, Abhyankar S GD. Cytokine storm of graftversus-host disease: a critical effector role for interleukin-1.
 47. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Lancet [Internet].

- 2020;395(10229):1033–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
48. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(1):16–32.
 49. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020;8(6):e46–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30216-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30216-2)
 50. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(6):363–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
 51. Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.
 52. Zhou F et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study.
 53. Zhou Y et al. Pathogenic T cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storm in severe COVID-19 patients.
 54. Jose, R.J., and Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation.
 55. Karki et al. Synergism of $\text{tnf-}\alpha$ and $\text{ifn-}\gamma$ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in sars-cov-2 infection and cytokine shock syndromes.
 56. Silvín, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A.G., Dubuisson, A., Derosa, L., Almire, C., Henon, C., Kosmider, O., Droin, N. et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19.
 57. Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., Zhang, P., Liu, X., Gao, G., Liu, F., Jiang, Y., Cheng, X., Zhu, C., & Xia Y. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. *Emerging microbes & infections*.
 58. Cruz, A. S., Mendes-Frias, A., Oliveira, A. I., Dias, L., Matos, A. R., Carvalho, A., Capela, C., Pedrosa, J., Castro, A. G., & Silvestre R. Interleukin-6 is a biomarker for the development of fatal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 pneumonia.
 59. Fan BE. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection: a reply. *Am J Hematol*. 2020;95(8):E215.
 60. Fan BE, Chong VCL, Chan SSW et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection.
 61. Chen N, Zhou M, Dong X et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study.
 62. D.M. Jacinto, T.Z. Ferreira, I.Y. Takihi, A. Firmiano, J. Sá, A.D.S.B. Perazzio, M.C.A. Silva, M.V. Gonc, alves, A.F. Sandes MLLF. Descrição das alterações do hemograma correlacionados à proteína C reativa (PCR) e ferretina em 7942 pacientes com covid -19.
 63. GUPTA S et al. Factors Associated With Death in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019 in the US.
 64. GUPTA A et al. Extra pulmonar manifestations of COVID-19.
 65. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China.
 66. Lippi G PM. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection.
 67. Corman VM, Landt O, Kaiser M et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.

68. Mardani R, Ahmadi Vasmehjani A, Zali F, Nasab SDM, Kaghazian H, Kaviani M et al. Laboratory. Parameters in Detection of COVID-19 Patients with Positive RT-PCR; a Diagnostic Accuracy Study.
69. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa.
70. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020;12(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
71. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in covid-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;221(11):1762–9.
72. Qu R, Ling Y, Zhang Y hui zhi, Wei L ya, Chen X, Li X mian, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol*. 2020;92(9):1533–41.
73. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105–9.
74. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1131–4.
75. Kittu D, Periyasamy S, Kadar ZB. Predictors of Mortality due to COVID-19 Infection among Adults: A Cross-sectional Study. *J Clin Diagnostic Res*. 2022;16(2):22–6.
76. Singh R, Rathore SS, Khan H, Karale S, Chawla Y, Iqbal K, et al. Association of Obesity With COVID-19 Severity and Mortality: An Updated Systemic Review, Meta-Analysis, and Meta-Regression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13(June):1–18.
77. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol*. 2020;95(7):834–47.
78. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(11):1061–9.
79. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020;8(5):475–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)
80. Arentz M, Yim E, Klaff L et al. characteristics and outcomes of 21 critically ill patients with COVID 19 in Washington State. 2020. p. 1612–4.
81. Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK, et al. Covid-19 in Critically Ill Patients in the Seattle Region — Case Series. *N Engl J Med*. 2020;382(21):2012–22.
82. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients with COVID-19 in Wuhan, China. *SSRN Electron J*. 2020;
83. Deng Y, Liu W, Liu K, Fang YY, Shang J, Zhou L, et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: A retrospective study. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(11):1261–7.
84. ML Martinsa, STF Grunewalda, CF Cunhab AF. Alterações Hematológicas em pacientes co COVID-19 hospitalizados: Estudo Retrospectivo. *hematol transfus cellt her*. 2021;43:S1–S546.

85. Fleury MK. A COVID-19 e o laboratório de hematologia: uma revisão da literatura recente. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2020;52(2):131–7.
86. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10229):1054–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
87. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020;506(March):145–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.022>

