



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Cecília Horta Ramalho Pinto

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS COMO FATORES DE PREDIÇÃO PRECOCE
DO DESFECHO DA COVID-19**

Belo Horizonte

2023

Cecília Horta Ramalho Pinto

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS COMO FATORES DE PREDIÇÃO PRECOCE
DO DESFECHO DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Linha de Pesquisa: COVID-19.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano Faria

Coorientadora: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Belo Horizonte

2023

043 Pinto, Cecília Horta Ramalho.
Parâmetros hematológicos como fatores de predição precoce do desfecho da Covid-19 [manuscrito] / Cecília Horta Ramalho Pinto. – 2023.
92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano Faria. Coorientadora: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Covid-19. 3. Biomarcadores. 4. Contagem de Células Sanguíneas. 5. Monócitos. I. Faria, Ana Maria Caetano. II. Carvalho, Andréa Teixeira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE CECILIA HORTA RAMALHO PINTO. Aos dezesseis dias do mês de maio de 2023 às 14:00 horas, reuniu-se de forma “on line”, utilizando a plataforma “Google Meet”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Parâmetros Hematológicos como Fatores de Predição Precoce do Desfecho da COVID-19", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Olindo Assis Martins Filho (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas), aprovada; Dr. Luis Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - Coorientadora (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata **foi considerada:**

APROVADA

REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de maio de 2023.

Olindo Assis Martins Filho

Dr. Olindo Assis Martins Filho (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas)

Dr. Luis Henrique Franco (UFMG)

Luis Henrique Franco

apl
 Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - Coorientadora (Instituto René Rachou - Fiocruz Minas)

Anamaria@aria

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Maria Caetano Faria, pela orientação, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança, pelo apoio e pela inspiração durante a minha trajetória do mestrado.

À professora Andréa Teixeira de Carvalho, pela coorientação, pelas discussões de grande valor e pelos conselhos científicos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos os amigos e colaboradores do Laboratório de Imunobiologia (LIB), pelas trocas científica e pelos momentos de diversão.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa em Imunobiologia do Envelhecimento (GIBE) e do Grupo Integrado de Pesquisa com Biomarcadores (GIPB) pela parceria, acolhimento e ótimas discussões científicas.

Aos professores Matheus de Souza Gomes, Laurence Rodrigues do Amaral e Pedro Luiz Lima Bertarini pela paciência e auxílio na execução das análises de árvore de decisão essenciais para o projeto.

Ao Alexandre, da secretaria do Programa de Pós-graduação, por todo o auxílio durante o processo de solicitação do mestrado acelerado.

Aos meus pais e à minha família, pelos ensinamentos, pela motivação e pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos, que considero minha segunda família, pelo companheirismo durante todas as fases da minha vida.

RESUMO

Novos medicamentos antivirais para a COVID-19, como Paxlovid e Molnupiravir, são mais eficazes se administrados nos primeiros cinco dias após o início dos sintomas, ajudando os pacientes com alto risco de desenvolver a forma grave de COVID-19 a evitar a hospitalização. Assim, quanto mais cedo os pacientes que podem se beneficiar dessas drogas forem identificados, melhores serão suas chances de sobrevivência. Embora a infecção por SARS-CoV-2 já tenha alguns grupos de risco estabelecidos, como indivíduos do sexo masculino, idosos e pessoas com comorbidades, ainda é necessário encontrar biomarcadores de desfechos da doença para estratificar o risco dos pacientes e aprimorar o manejo clínico. O hemograma pode ser uma opção viável, eficiente e acessível para encontrar biomarcadores que predizem o prognóstico da doença, uma vez que essa infecção viral pode alterar diversos parâmetros sanguíneos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar uma possível associação entre parâmetros hematológicos e diferentes formas clínicas de COVID-19 e usá-los como preditores de desfechos da doença. Para isso, realizamos hemograma em amostras de sangue de 297 indivíduos tratados em serviço de saúde de referência em Belo Horizonte/MG, Brasil, e observamos que, nos primeiros 4 dias de sintomas, as alterações hematológicas clássicas da COVID-19, como a linfopenia, ainda não são perceptíveis. No entanto, o percentual de monócitos (MON%) e a razão entre os números de granulócitos e linfócitos (GLR) já se apresentavam diminuídos e elevados, respectivamente, nesse período em pacientes que apresentavam sintomas leves e que, posteriormente, progrediram para a forma grave da doença e necessitaram de internação hospitalar. Também observamos que durante esse período, a razão entre o número de plaquetas e linfócitos (PLR) foi capaz de diferenciar pacientes com COVID-19 de indivíduos com síndrome gripal ou controles negativos. Realizamos curvas ROC e TG-ROC, bem como algoritmos de Árvore de Decisão, para avaliar a acurácia desses preditores hematológicos e estabelecer seus valores de corte. Assim, nossos achados demonstraram que pacientes com COVID-19 com valores de MON% menor que 7,7% e GLR maior que 8,75 são atribuídos ao grupo hospitalizado com uma precisão de 86%. Isso sugere que esses índices hematológicos podem ser biomarcadores importantes na predição de desfechos de doenças e podem ser utilizados para discriminar pacientes na admissão hospitalar e conduzir abordagens terapêuticas,

como antivirais, no início da infecção.

Palavras-chave: Hemograma. Preditores. COVID-19. GLR. Monócitos.

ABSTRACT

Novel antiviral COVID-19 medications, such as Paxlovid and Molnupiravir, are most effective if administered within the first five days of symptoms, helping patients with a high risk of developing the severe form of COVID-19 to avoid hospitalization. Hence, the sooner patients who may benefit from these drugs are identified, the better their chances of survival. Although the SARS-CoV-2 infection already has some established risk groups, such as men, elderly people, and people with comorbidities, it is still necessary to find biomarkers of disease outcomes to stratify patients' risk and improve clinical management. The complete blood count (CBC) can be a viable, efficient, and affordable option to find biomarkers able to predict the prognosis of the disease, since this viral infection can alter various blood parameters. Therefore, the goal of the present study was to identify a possible association between hematological parameters and different clinical forms of COVID-19 and use them as predictors of disease outcomes. We performed a CBC in blood samples from 297 individuals treated in Belo Horizonte, Brazil, and observed that in the first 4 days of symptoms the classic hematological COVID-19 alterations, such as lymphopenia, are not yet perceptible. However, the percentage of monocytes (MON%) and the granulocyte-to-lymphocyte ratio (GLR) were already reduced and increased, respectively, during this period in patients who presented mild symptoms and who later progressed to the severe form of the disease and required hospitalization. We also observed that during this period, the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) was able to differentiate COVID-19 patients from individuals with flu-like symptoms or negative controls. We performed ROC and TG-ROC Curves, as well as Decision Tree algorithms, to evaluate the accuracy of these hematological predictors and to establish their cutoff values. Thus, our findings demonstrated that patients with COVID-19 with MON% values lower than 7.7% and GLR values greater than 8.75 are assigned to the hospitalized group with a precision of 86%. This suggests that these variables can be important biomarkers in predicting disease outcomes and could be used to discriminate patients at hospital admission and manage therapeutic approaches, such as antivirals, in the beginning of infection.

Keywords: Complete Blood Count. Predictors. COVID-19. GLR. Monocytes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2..... | 14 |
| FIGURA 2. Esquema ilustrando a ligação entre a glicoproteína <i>spike</i> (proteína S) do SARS-CoV-2 e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE-2) presente em células humanas | 15 |
| FIGURA 3. Fisiopatologia e sintomas da COVID-19..... | 17 |
| FIGURA 4. Exemplo e explicação da curva ROC | 30 |
| FIGURA 5. Exemplo de curva TG-ROC..... | 32 |
| FIGURA 6. Representação de uma árvore de decisões com nó raiz, nós de decisão e nós folha | 33 |
| FIGURA 7. Esquema dos grupos com 1 a 4 dias de sintomas incluídos no estudo | 39 |
| FIGURA 8. Esquema dos grupos com 5 a 15 dias de sintomas incluídos no estudo | 40 |
| FIGURA 9. Análise hematológica de indivíduos com 1 – 4 dias de sintomas..... | 44 |
| FIGURA 10. Análise hematológica de indivíduos controle negativos ou com COVID-19 com 5 – 15 dias de sintomas..... | 47 |
| FIGURA 11. Comparação da análise hematológica de COVID-19 Leve, Internados e Progressão..... | 49 |
| FIGURA 12. Desempenho de MON% em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC..... | 52 |
| FIGURA 13. Desempenho de GLR em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC..... | 52 |
| FIGURA 14. Desempenho de PLR em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC..... | 52 |
| FIGURA 15. Árvore de decisão do diagnóstico da COVID-19 | 56 |
| FIGURA 16. Árvore de decisão da gravidade da COVID-19. | 57 |
| FIGURA 17. Comparação dos preditores hematológicos entre os gêneros feminino (F) e masculino (M) | 58 |
| FIGURA 18. Comparação dos preditores hematológicos entre idades: adulto (18-59 anos) e idoso (>60)..... | 58 |
| FIGURA 19. Comparação dos preditores hematológicos entre indivíduos com (C) ou sem comorbidades (SC)..... | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Interpretação do valor da Área Sob a Curva (AUC) da curva ROC | 30 |
| TABELA 2. Características demográficas e clínicas dos voluntários incluídos no estudo. | 39 |
| TABELA 3. Representação dos valores de p por asteriscos | 42 |
| TABELA 4. Valores de referência dos parâmetros hematológicos | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACE2 – *Angiotensin-Converting Enzyme-2* (Enzima Conversora da Angiotensina 2).
- AUC – *Area Under the Curve* (Área Sob a Curva).
- CBC – *Complete Blood Count* (Contagem Completa do Sangue).
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* (Centros de Controle e Prevenção de Doenças).
- CAPPE – Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa e Extensão
- COEP-UFMG – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.
- CONEP – Comitê Nacional de Ética.
- COVID-19 – *Coronavirus Disease-19*.
- CoV – Coronavírus.
- dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA de Fita Dupla).
- Fig. – Figura.
- GLR – Razão de Granulócitos por Linfócitos.
- HCM – Hemoglobina Corpuscular Média.
- IC – Intervalo de Confiança.
- LOOCV – *Leave-One-Out Cross Validation*.
- LR – *Likelihood Ratio* (Razão de Verossimilhança)
- LYM*PLT – Linfócitos multiplicados por Plaquetas.
- MERS – *Middle East Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória do Oriente Médio).
- MLR – Razão de Monócitos por Linfócitos.
- MON% – Porcentagem de Monócitos.
- NET – *Neutrophil Extracellular Traps* (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
- NLR – Razão de Neutrófilos por Linfócitos.

ns – Não Significativo.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PLR – Razão de Plaquetas por Linfócitos.

PLT – Plaquetas.

PRR – *Pattern Recognition Receptors* (Receptor de Reconhecimento de Padrões).

RDW – *Red Cell Distribution Width* (Amplitude de Distribuição de Hemácias).

ROC – *Receiver Operating Characteristic*.

RT-qPCR – *Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia da Polimerase Quantativa por Transcriptase Reversa).

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2).

SARS – *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória Aguda Grave).

Se – Sensibilidade.

Sp – Especificidade.

SRAG – Síndrome Respiratória Aguda Grave.

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TG-ROC – *Two Graph Receiver Operating Characteristic*.

TLR - *Toll-like receptor* (Receptor *Toll-like*).

UPA – Unidade de Pronto Atendimento.

UTI – Unidade de Terapia Intensiva.

VCM – Volume Corpuscular Médio.

vs. – Versus.

µL – Microlitros.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1. COVID-19..... | 13 |
| 1.2. Profilaxia e Tratamentos Antivirais para a COVID-19..... | 18 |
| 1.3. Hemograma Completo Automatizado..... | 21 |
| 1.4. Índices e Razões Hematológicas..... | 23 |
| 1.5. Parâmetros Hematológicos e a COVID-19..... | 24 |
| 1.6. Curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) para a Validação de Biomarcadores e Preditores de Desfecho..... | 28 |
| 1.7. Árvore de Decisão para Classificação e Regressão de Variáveis..... | 32 |
| 2. OBJETIVO..... | 36 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 36 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 36 |
| 3. POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 3.1. Recrutamento de Voluntários..... | 37 |
| 3.2. População de Estudo..... | 37 |
| 3.3. Hemograma Completo..... | 40 |
| 3.4. Análises Estatísticas..... | 41 |
| 4. RESULTADOS..... | 43 |
| 4.1. Alterações hematológicas clássicas da COVID-19 geralmente aparecem dentro de 5 – 15 dias após o início dos sintomas..... | 43 |
| 4.2. Alterações hematológicas em pacientes com 1 – 4 dias de sintomas são capazes de diferenciar as formas clínicas de COVID-19..... | 45 |
| 4.3. MON% e GLR podem ser utilizados como preditores da necessidade de internação hospitalar..... | 47 |
| 4.4. Desempenho dos preditores hematológicos de acordo com as curvas ROC e TG-ROC..... | 50 |
| 4.5. Proposta de algoritmo de árvore de decisão para classificar pacientes com COVID-19..... | 55 |
| 4.6. Os preditores hematológicos MON%, GLR e PLR não apresentam diferenças entre os diferentes grupos de risco..... | 60 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 55 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 68 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. COVID-19

A *coronavirus disease-19* (COVID-19), causada pelo vírus SARS-CoV-2, é uma doença infecciosa que foi caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como pandemia em 2020 (“Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51”, [s.d.]). Por tratar-se de uma doença nova que se espalhou rapidamente pelo mundo, a COVID-19 trouxe inúmeros desafios para o campo médico, exigindo pesquisas com o objetivo de desenvolver vacinas e tratamentos. Devido à sua alta transmissibilidade, essa infecção resultou em altas taxas de hospitalização e mortalidade, com um consequente impacto na economia global e ampla mobilização de recursos médicos em todo o mundo (UMAKANTHAN et al., 2020).

O SARS-CoV-2, sigla para *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*, é um β -coronavírus envelopado, com um RNA senso positivo, tipicamente transmitido de pessoa para pessoa por contato ou por partículas de aerossóis (UMAKANTHAN et al., 2020). Acreditava-se que os coronavírus (CoVs), membros da família *Coronaviridae* e da subfamília *Coronavirinae*, causassem principalmente infecções zoonóticas em pássaros e mamíferos. No entanto, os surtos recorrentes de outros CoVs, como a *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS), e agora SARS-CoV-2, demonstraram claramente a capacidade desses vírus de cruzarem as barreiras entre espécies e se disseminarem entre humanos (MENACHERY; GRAHAM; BARIC, 2017). Embora *Coronaviridae* seja uma família de vírus que causou outras epidemias de grande escala no passado, como da SARS-CoV (2002-2003) e da MERS (2012), nenhuma dessas resultou em um número de mortes tão elevado como a 2020 - 2023, causada pelo SARS-CoV-2 (CHENG et al., 2007). Até o dia 3 de maio de 2023, foram confirmados 765.222.932 casos de COVID-19, com uma taxa de letalidade de, aproximadamente, 1%, resultando em 6.921.614 mortes mundialmente. No Brasil, que teve o primeiro caso de COVID-19 notificado pelo Ministério da Saúde em 26 de fevereiro de 2020, atualmente se apresenta como o país com o 5º maior número de casos registrados no mundo inteiro e o 2º país com maior número de mortos. Até 3 de maio de 2023, foram confirmados 37.449.418 casos, com uma

letalidade de 701.494 pessoas (“WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data”, [s.d.]).

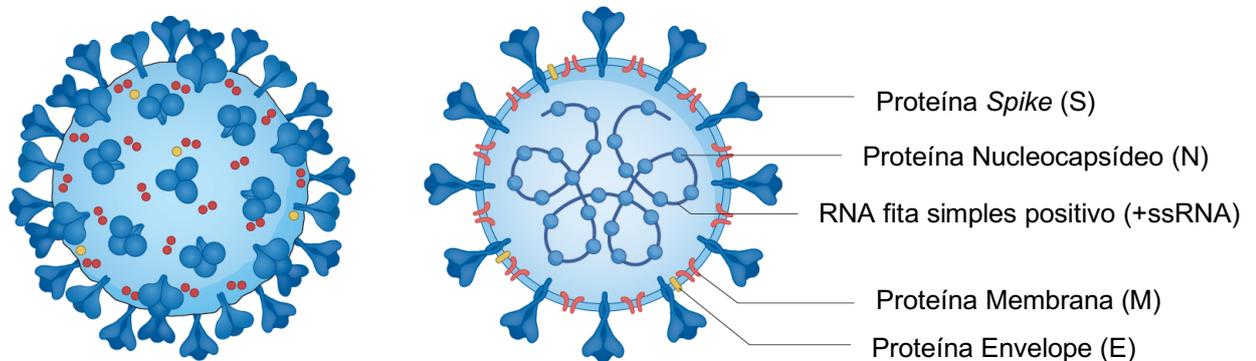


FIGURA 1. Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2. As proteínas *spike* (S), nucleocapsídeo (N), membrana (M) e envelope (E) estão representadas na figura. Além disso, é possível observar o genoma de RNA de fita simples positiva. FONTE: Adaptada da versão original de Lamers, M.M., Haagmans, B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 20, 270–284 (2022).

A primeira etapa de uma infecção viral é a entrada do vírus nas células hospedeiras. Para isso, o SARS-CoV-2, que possui quatro proteínas estruturais: S (*spike*), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo) (**Fig. 1**), utiliza a glicoproteína *spike* presente em seu envelope viral para se ligar ao seu receptor, a enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2). Esse receptor é expresso em vários graus na membrana celular de quase todos os tecidos humanos, mas em maior abundância nas células do trato respiratório superior, local primariamente afetado pela infecção (JIA et al., 2005; XU et al., 2020). A ligação spike-ACE2 ativa a fusão da membrana do vírus e da célula hospedeira, o receptor ACE2 é internalizado junto com o vírus, e o RNA viral é subsequentemente liberado no citoplasma, iniciando o estabelecimento do processo infeccioso (NI et al., 2020) (**Fig. 2**).

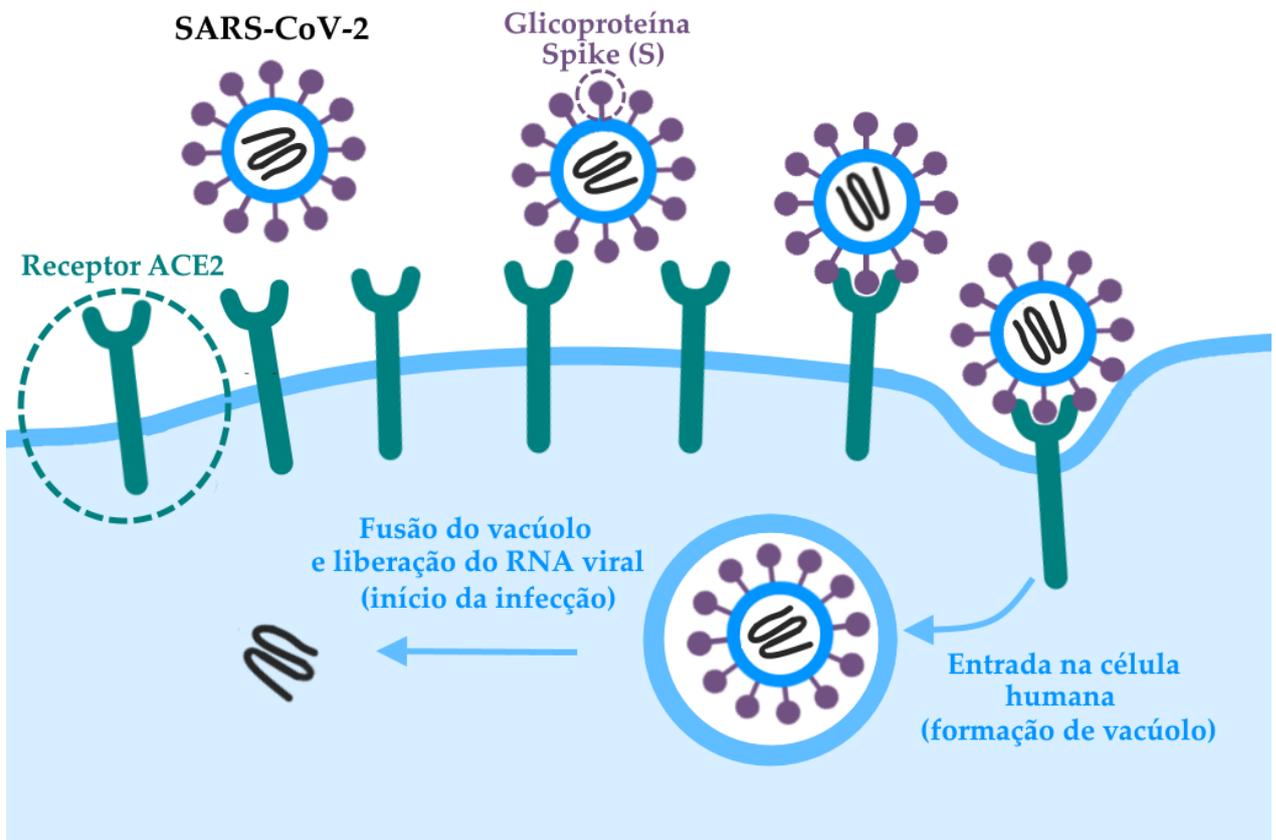


FIGURA 2. Esquema ilustrando a ligação entre a glicoproteína *spike* (proteína S) do SARS-CoV-2 e a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE-2) presente em células humanas. Após a ligação da *spike* com a ACE-2, a célula internaliza a partícula viral em um vacúolo, que depois se funde ao envelope viral, liberando o material genético que dará início à infecção.
 FONTE: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/glossario/>. Acesso em: 6 março 2023.

Uma vez que o vírus entra em uma célula hospedeira, a síntese de proteínas acessórias, que são dispensáveis para replicação, mas muitas vezes têm atividades imunoevasivas, e proteínas estruturais começa com os processos de transcrição e tradução (LAMERS; HAAGMANS, 2022). A síntese do novo genoma de RNA viral ocorre com a ajuda da RNA polimerase dependente de RNA (CHILAMAKURI; AGARWAL, 2021). Durante esse processo, as proteínas replicase formam fábricas de replicação a partir das membranas do retículo endoplasmático que contêm vesículas de membrana dupla nas quais ocorre a transcrição, protegendo os intermediários de transcrição de RNA de fita dupla (dsRNA) da detecção por receptores de reconhecimento de padrões citoplasmáticos (PRRs). Acredita-se que o principal PRR citoplasmático capaz de detectar SARS-CoV-2 seja o MDA5 que, reconhece dsRNAs longos e inicia uma cascata de sinalização para promover a transcrição dos interferons tipo I e tipo III. Interferons e quimiocinas também são produzidos por células epiteliais e células

imunes locais, como neutrófilos e macrófagos, em resposta à detecção de SARS-CoV-2 usando receptores endossomais *Toll-like* (TLRs), quimiocinas ou efeitos parácrinos de interferons produzidos localmente (LAMERS; HAAGMANS, 2022; WONG, 2021). Os interferons sinalizam de forma autócrina e parácrina para induzir um estado celular antiviral através da produção de genes estimulados por interferon, que podem ter funções antivirais diretas ou indiretas, como pela atração de células imunes. Durante a patogênese, os granulócitos desempenham papel fundamental, visto que a ativação de neutrófilos promove a formação de armadilhas extracelulares (NET), agregação plaquetária e dano celular (ILIADI et al., 2021). Ao mesmo tempo, a produção de citocinas também promove o desenvolvimento de respostas adaptativas de células B e células T que ajudam a eliminar o vírus. Se o vírus não for eliminado por respostas inatas ou adaptativas, ele pode se espalhar para o trato respiratório inferior por inalação de partículas virais do trato respiratório superior ou por disseminação gradual ao longo da árvore traqueobrônquica. Alternativamente, o local inicial da infecção pode ser o trato respiratório inferior. Isso pode levar à infecção dos alvéolos, causando inflamação e limitando as trocas gasosas (LAMERS; HAAGMANS, 2022).

Dessa forma, o vírus estimula uma hiperativação de uma resposta inflamatória sistêmica. Uma característica comum da doença é o fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas”. A tempestade de citocinas ocorre quando um sistema imunológico é superativado por infecção, medicamento e/ou algum outro estímulo, levando a uma condição de hiperinflamação sistêmica descontrolada, com altos níveis de citocinas e quimiocinas sendo liberados na circulação com uma distribuição generalizada e prejudicial impacto em vários órgãos (TISONCIK et al., 2012). Esse fenômeno já foi relacionado à rápida deterioração clínica e alto risco de letalidade na COVID-19 grave, assim como à síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (BEHRENS; KORETZKY, 2017; MEHTA et al., 2020). Além disso, essa infecção induz diminuição da produção de células-tronco hematopoiéticas, diminuição do número de linfócitos (linfopenia), e ativação da cascata de coagulação (MINA; BESIEN; PLATANIAS, 2020; LUCAS et al, 2020). Todas essas alterações são mecanismos patogênicos da doença que podem resultar em febre, comprometimento de tecidos e perda de função respiratória que, por sua vez, pode levar à necessidade de internação e ventilação mecânica (**Fig. 3**).

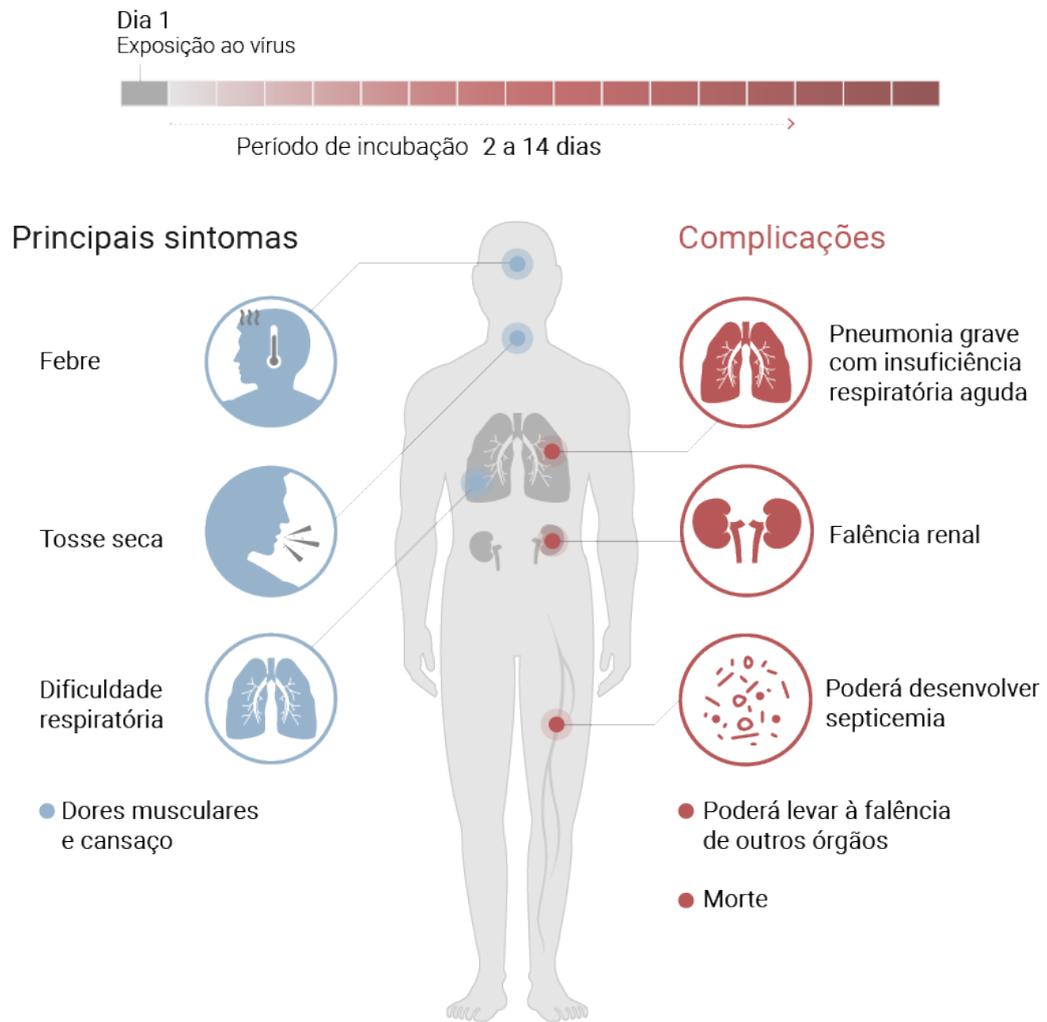


FIGURA 3. Fisiopatologia e sintomas da COVID-19. Ilustração da fisiopatologia da COVID-19 com os principais sintomas (febre, tosse seca, dificuldade respiratória e dores musculares e cansaço), assim como as possíveis complicações (pneumonia grave com insuficiência respiratória aguda, falência renal, septicemia, falência de órgãos e até mesmo a morte). FONTE: https://www.rtp.pt/noticias/mundo/coronavirus-o-que-e-e-como-comecou_i1203294. Acesso em: 6 março 2023.

A COVID-19 pode se manifestar de forma assintomática, leve, moderada, grave ou crítica, como uma SRAG (GIBSON; QIN; PUAH, 2020). Os pacientes assintomáticos são aqueles que testaram positivo para a presença de RNA do SARS-CoV-2, mas que não apresentam quaisquer sintomas clínicos e possuem a imagem da tomografia computadorizada do tórax sem alterações. Os pacientes com a forma leve apresentam sintomas gripais, incluindo principalmente febre, fadiga, tosse, dor de garganta, coriza e mialgia, ou sintomas digestivos, como náuseas, vômitos e diarreia, e se recuperam sem a necessidade de suporte hospitalar. Já os pacientes moderados e graves podem apresentar, além da febre

frequente e tosse, pneumonia com ou sem hipoxemia e lesões nos resultados da tomografia computadorizada de tórax, sendo que a opacidade em vidro fosco é a alteração pulmonar típica, normalmente distribuídas periféricamente e nas regiões subpleurais (COZZI et al., 2021). Por fim, os pacientes com a forma clínica crítica apresentam SRAG e podem sofrer de choque, encefalopatia, lesão miocárdica, insuficiência cardíaca, disfunção da coagulação e lesão renal aguda, podendo resultar no óbito (BÖSMÜLLER et al., 2021; YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). Geralmente os pacientes com COVID-19 que possuem o prognóstico de moderado a crítico podem necessitar de internação hospitalar com tratamentos invasivos e suplementação de oxigênio.

A maioria dos indivíduos infectados apresentam apenas sintomas leves, porém indivíduos com idade acima de 60 anos e indivíduos portadores de comorbidades, como hipertensão, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes, constituem dois dos principais grupos de risco e possuem maior probabilidade de desenvolver a infecção com lesões pulmonares graves e eventual morte (EJAZ et al., 2020). Além disso, já foram observadas diferenças nas respostas imunológicas entre pacientes dos sexos masculino e feminino durante o curso da infecção por SARS-CoV-2. Essa diferença se evidencia, principalmente, em uma resposta menos robusta de linfócitos T e níveis mais elevados de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias em pacientes masculinos, quando comparados aos pacientes do sexo feminino, resultando em uma pior evolução da COVID-19 (TAKAHASHI et al., 2020). Embora os grupos de riscos sejam bem definidos, o prognóstico da doença parece ser multifatorial, tornando biomarcadores e preditores do desfecho da doença necessários para a estratificação de risco dos pacientes e para facilitar a gestão hospitalar e o uso eficiente de recursos médicos escassos.

1.2. Profilaxia e Tratamentos Antivirais para a COVID-19

O sequenciamento relativamente rápido do genoma do SARS-CoV-2 permitiu o rastreamento epidemiológico e o desenvolvimento de testes de diagnóstico, métodos preventivos e de tratamento (MOHAMMED et al., 2022). Para o controle da doença, foram necessários esforços para o desenvolvimento de vacinas para limitar a transmissão de SARS-CoV-2. Enquanto o desenvolvimento de uma nova vacina pode levar de 10 a 15 anos, envolvendo as fases dos estudos pré-clínicos,

as três fases de ensaios clínicos em humanos e a aprovação de órgãos reguladores, pela necessidade urgente de desenvolver uma vacina protetora contra a COVID-19, fases de desenvolvimento de vacinas foram combinadas para acelerar o processo (SHARMA et al., 2020). Nesse tempo, foram desenvolvidas vacinas de RNA mensageiro, vacinas à base de adenovírus, vacinas de vírus inativados e vacinas à base de subunidade de proteína por grupos farmacêuticos como *Pfizer/BioNTech*, *Moderna*, *Oxford/AstraZeneca*, *Janssen (Johnson & Johnson)*, *Sinovac*, entre outros (MOHAMMED et al., 2022).

De acordo com a OMS, até 30 de abril de 2023, um total de 13.346.989.954 doses de vacina foram administradas mundialmente (“WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data”, [s.d.]). O uso de vacinas reduziu com sucesso as taxas de infecções, gravidade, hospitalização e letalidade entre as diferentes populações desde o início da distribuição das vacinas (MOHAMMED et al., 2022). Além disso, Tran et al. já relataram que a vacinação contra a COVID-19 reduz tanto a gravidade quanto a duração da COVID-19 longa. A COVID-19 longa, que é caracterizada por sintomas duradouros que persistem por mais de três meses após a infecção, variando de falta de ar e dores musculares a confusão mental e dores de cabeça, afetam cerca de uma em cada dez pessoas no Reino Unido (TRAN et al., 2023).

Entretanto, mesmo com a administração de vacinas e diminuição considerável da ocorrência de casos graves de COVID-19, alguns pacientes ainda desenvolvem a forma grave da doença e necessitam de hospitalização. Atualmente, as diretrizes de tratamento para casos graves e críticos, especialmente para pacientes que desenvolvem a SRAG e/ou disfunção de múltiplos órgãos, ainda apresentam limitações e não são totalmente eficazes. Portanto, melhor do que a intervenções de suporte invasivas, como a intubação de pacientes, que, frequentemente, falham em prevenir a letalidade, a predição do prognóstico grave e o tratamento precoce podem ser mais eficientes para evitar a progressão da doença (HARAPAN et al., 2020). Sol et al. relataram menor mortalidade de pacientes com COVID-19 pelo reconhecimento precoce e intervenção de pacientes com a doença grave na província de Jiangsu (SUN et al., 2020a). Recentemente, novos tratamentos antivirais para COVID-19 foram aprovados por agências reguladoras nacionais de saúde em todo o mundo, como FDA (Estados Unidos da América), Anvisa (Brasil)

e *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency* (Reino Unido). Até o momento, três medicações desse grupo já foram testadas e aprovadas em vários países: o Remdesivir (da farmacêutica Gilead Sciences), o Paxlovid (Pfizer) e o Molnupiravir (MSD). Esses medicamentos, que podem ser administrados por via oral ou via intravenosa, podem reduzir as taxas de internação de pacientes de alto risco. No entanto, os antivirais funcionam melhor no início da infecção, visto que os seus mecanismos de ação se baseiam, principalmente, em alterações na função da exonuclease viral e na interferência nas vias de replicação do vírus reguladas pelo hospedeiro, além de regular positivamente os mecanismos antivirais inatos por meio da amplificação da detecção de RNA citoplasmático e das vias de interferon tipo 1 (KAUSAR et al., 2021; MALINIS et al., 2020). O Paxlovid, por exemplo, exerce sua eficácia antiviral inibindo a M^{pro} (*main protease*), também conhecida como 3CL^{pro}, uma protease necessária para o processo de replicação viral (MARZI et al., 2022). Com isso, o patógeno tem sua replicação inibida e apresenta maior dificuldade de invadir as células, resultando em uma menor probabilidade do quadro infeccioso do paciente se agravar e necessitar de suporte hospitalar.

De acordo com a Pfizer, empresa que fabrica o Paxlovid, o uso do medicamento resultou em uma redução de 70% na hospitalização e nenhum óbito na população tratada, em comparação com o grupo placebo. Além disso, um estudo clínico publicado em 2021 no periódico *The New England Journal of Medicine* revelou que a aplicação precoce do medicamento antiviral Remdesivir, nos primeiros dias da doença, resultou em um risco 87% menor de hospitalização ou morte entre os pacientes de alto risco, como idosos e portadores de comorbidades, em comparação ao grupo placebo (GOTTLIEB et al., 2022). Ademais, já foi visto que, para serem efetivos, esses tratamentos devem ser iniciados nos primeiros 5 dias de sintomas (SARAVOLATZ; DEPCINSKI; SHARMA, 2023). Dessa forma, métodos de diagnóstico inicial, pouco invasivos, como por exemplo parâmetros hematológicos, são fundamentais para orientar com acurácia a melhor conduta a ser realizada com os pacientes no início dos sintomas, conseqüentemente melhorando o manejo clínico, o tratamento e, possivelmente, a taxa de sobrevivência.

1.3. Hemograma Completo Automatizado

O hemograma completo é uma técnica de exame de rotina fácil, barata, utilizada mundialmente e que fornece informações sobre o conteúdo do sangue. Ele constitui um dos principais exames solicitados na prática clínica, utilizado para auxiliar no diagnóstico, classificação e monitoramento de uma ampla variedade de doenças (TURKMEN et al., 2014). O sangue, que tem 55% do seu volume total representado pelo plasma, constituído por água, sais minerais, vitaminas, proteínas, carboidratos, lipídios, e fatores de coagulação, tem apenas a sua parte sólida analisada no hemograma (CELKAN, 2020). Assim, o resultado do hemograma, que avalia as células sanguíneas de um indivíduo, pode ser dividido em três partes: série vermelha (análise de hemácias), série branca (análise de leucócitos) e série plaquetária (análise de plaquetas).

É possível usar técnicas manuais, semiautomáticas ou automatizadas para determinar os vários componentes do hemograma completo. As técnicas manuais são geralmente de baixo custo em relação a equipamentos e reagentes, mas são trabalhosas; as técnicas automatizadas acarretam altos custos de capital, mas permitem a realização rápida de muitos hemogramas por menos trabalhadores de laboratório. As técnicas automatizadas são mais precisas, mas sua precisão depende da calibração correta e do uso de reagentes que geralmente são específicos para o analisador em particular. Muitos laboratórios agora usam quase exclusivamente técnicas automatizadas, mas certas técnicas manuais são necessárias como métodos de referência para padronização ou até mesmo para validar uma contagem automática. Métodos manuais também podem ser necessários para lidar com amostras que possuem características incomuns que podem dar resultados discrepantes com analisadores automatizados (BRIGGS; BAIN, 2017).

Patenteada por Wallace Coulter, na década de 1950, o primeiro aparelho de hemograma eletrônico e automatizado, conhecido como *The Coulter Counter*, era capaz de realizar apenas a contagem de hemácias e leucócitos (ROBINSON, 2013). Esse equipamento realizava as contagens de células por meio de uma tecnologia baseada na impedância elétrica, também conhecida como o Princípio de Coulter, na qual as células sanguíneas são contadas e medidas a partir das mudanças mensuráveis dos impulsos elétricos que geram quando imersas em

uma solução eletrolítica (GRAHAM, 2021). Esse contador primitivo permite que o interior do equipamento se comunique com o seu exterior por um orifício de pequeno diâmetro, com um dos eletrodos metálicos, sendo um interno e o outro externo, e uma fonte geradora de corrente contínua. Assim, uma bomba aspira o sangue, apropriadamente diluído em solução eletrolítica, de fora para dentro do aparelho, por meio do orifício. Ao cruzarem individualmente o orifício, os glóbulos, pela menor condutividade, desencadeiam pulsos de impedância, sentidos pelo galvanômetro do instrumento. A mudança na impedância é proporcional ao volume da célula, resultando em uma contagem de células e medida de volume individual das partículas, que é convertida em número de glóbulos por μL de sangue.

A partir da análise de impedância elétrica é possível diferenciar os leucócitos em granulócitos, linfócitos e monócitos, mas não é possível distinguir entre os granulócitos de tamanho semelhante: eosinófilos, basófilos e neutrófilos. Assim, com o tempo, os aparelhos de hemograma foram se modernizando e adicionando novos parâmetros de análises. Atualmente, a maioria dos equipamentos de hemograma são automatizados e realizam quantificações multiparamétricas no sangue total.

Muitos aparelhos de hemograma utilizam, além da impedância elétrica, a tecnologia da citometria de fluxo. Esse método se baseia no fluxo de uma célula única por um capilar, que é interceptado por um feixe de laser. Conforme o feixe de luz laser atinge uma célula, parte dele é absorvido pela célula, e a outra parte se espalha em várias direções. Um detector captura a luz de dispersão direta que é proporcional ao tamanho da célula e um segundo detector captura a luz de dispersão lateral, que corresponde à complexidade nuclear e granulosidade do citoplasma (“Practical Flow Cytometry - Howard M. Shapiro - Google Books”, [s.d.]). A citometria de fluxo a laser, apesar de ser mais cara devido à necessidade de reagentes caros, fornece informações detalhadas sobre a morfologia das células sanguíneas, conseguindo diferenciar os leucócitos em linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos (EL-HAJJAR; ALI AHMAD; NASR, 2023). Para avaliar outros parâmetros, como a concentração de hemoglobina, por exemplo, a absorvância de luz pela célula é quantificada. Essa quantificação é medida por espectrofotometria de absorção, que mede quanta luz é absorvida por uma amostra em uma faixa de comprimentos de onda definidos pelo espectro

eletromagnético. Nesse cenário, quanto mais hemoglobina, mais luz é absorvida (WHITEHEAD et al., 2019).

1.4. Índices e Razões Hematológicas

Além das quantificações e parâmetros fornecidos pelo equipamento do hemograma, existem índices que podem ser obtidos pela razão ou multiplicação de mais de um parâmetro. Esses índices podem se basear na razão de neutrófilos por linfócitos [neutrophil-lymphocyte ratio (NLR)], na razão de monócitos por linfócitos [monocyte-lymphocyte ratio (MLR)], na razão de granulócitos por linfócitos [granulocyte-lymphocyte ratio (GLR)], na razão de plaquetas por linfócitos [platelet-lymphocyte ratio (PLR)], ou até mesmo na multiplicação do número total de linfócitos pelo número de plaquetas (LYM*PLT). Esses parâmetros são extremamente úteis e econômicos, visto que é possível facilmente calcular as proporções apenas pela divisão ou multiplicação do número absoluto da célula em questão pelo número absoluto de linfócitos, obtidos pelo hemograma completo.

Alterações nesses índices já foram associados a diversas doenças, crônicas ou infecciosas, sendo que, dentre esses, a razão mais conhecida e utilizada como parâmetro inflamatório é o NLR. Nos últimos anos, o NLR tornou-se uma modalidade fácil e prática para fornecer informações valiosas no diagnóstico e determinação de diversas doenças. Já foi observado que NLR elevado está associado a um pior prognóstico no câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de pulmão e malignidades ginecológicas (ZHANG et al., 2017). Ambos NLR e MLR são biomarcadores do microambiente tumoral que podem ser usados como fatores prognósticos, não apenas em tumores sólidos, mas também em neoplasias hematológicas (STEFANIUK; SZYMCZYK; PODHORECKA, 2020). Gao e colaboradores relataram que os níveis de MLR e PLR são mais altos em pacientes com osteoporose, quando comparado com pacientes com osteopenia, sendo que o MLR tem um maior valor diagnóstico para essa condição, podendo ser um novo potencial preditor barato e confiável (GAO et al., 2019). Além disso, já foi sugerido que o MLR desempenha um papel modesto na previsão de risco de tuberculose em bebês e pode ser utilizado como um preditor precoce de influenza em crianças (NARANBHAI et al., 2014; ZHU et al., 2020). Um baixo índice LYM*PLT também pode indicar infecção por influenza A em crianças com sintomas gripais (FEI;

ZHANG; ZHANG, 2019). Enquanto isso, já foi sugerido que o PLR esteja associado a condições reumatológicas (GASPARYAN et al., 2019) e ao câncer (LI et al., 2018). O GLR, por sua vez, já foi associado à progressão de tumores e menor sobrevida em humanos, e parece ser um parâmetro simples e clinicamente relevante para a avaliação do estresse perioperatório em pacientes submetidos à cirurgia colorretal (LIU et al., 2008; TABUCHI et al., 2011).

No contexto da COVID-19, o NLR foi um dos primeiros marcadores descritos como um preditor efetivo da gravidade da doença em estágios iniciais da infecção (ALY et al., 2021; LIU et al., 2020a). No estudo de Liu *et al.* (2020), foi relatado que os pacientes com $NLR \geq 3,13$ e com mais de 50 anos eram propensos à doença grave e, se necessário, deveriam ter acesso rápido à UTI. Além disso, já foi reportado que o coronavírus pode ter efeitos, principalmente, nos linfócitos T e, que o monitoramento do NLR e dos subgrupos de linfócitos é benéfico na detecção precoce de pacientes críticos, no diagnóstico e avaliação do tratamento da COVID-19 (QIN et al., 2020). Já foi mostrado que pacientes com casos graves de COVID-19 que precisam de internação apresentam uma maior razão do NLR e MLR, enquanto apresentam uma menor razão de PLR e $LYM*PLT$, quando comparado a pacientes com COVID-19 não internados (ASAN et al., 2021). Além disso, já foi visto que o MLR é maior em pacientes com COVID-19, especialmente naqueles com a doença grave, do que em pessoas não infectadas (SUN et al., 2020b). O GLR é significativamente maior no grupo COVID-19 grave do que no grupo COVID-19 não grave ou assintomático, bem como nos indivíduos saudáveis. De acordo com Kazancioglu *et al.*, maiores razões GLR e menores de MLR foram observadas em pacientes com COVID-19 grave (KAZANCIOGLU et al., 2021). Além disso, observou-se que o GLR foi associado positivamente com os escores de gravidade de tomografia computadorizada (TAN et al., 2020a). Ao comparar a área sob a curva (AUC) da curva ROC de inúmeros parâmetros e índices hematológicos, o NLR aparenta ser o melhor índice para a identificação precoce de pacientes com alto risco de desenvolver a doença grave (ASAN et al., 2021; LIN et al., 2021).

1.5. Parâmetros Hematológicos e a COVID-19

Entre as várias disfunções imunológicas, a mais relatada durante a COVID-19 é a linfopenia, ou seja, a diminuição do número absoluto de linfócitos abaixo dos

valores de referência. Estudos recentes relataram que aproximadamente 85% de pacientes com COVID-19 grave sofrem de linfopenia (HUANG et al., 2020; YANG et al., 2020a). Em particular, é comum uma diminuição, principalmente, nos linfócitos T CD4⁺ entre os pacientes com COVID-19, e mais evidente, nos casos graves, mas sem mudanças significativas no número de linfócitos CD8⁺ e linfócitos B (QIN et al., 2020). Assim, por estar correlacionado diretamente com a gravidade da doença, a linfopenia é um indicador eficaz e confiável da gravidade e hospitalização em pacientes com COVID-19 (TAN et al., 2020b). Consequentemente, o baixo número de leucócitos é relatado em diversos pacientes, dependendo da gravidade da doença e das condições subjacentes, sugerindo uma possível associação entre a gravidade da leucopenia e a gravidade da COVID-19 (KARIMI SHAHRI; NIAZKAR; RAD, 2021).

Em um estudo realizado com 2.510 indivíduos, Yun e colaboradores observaram que o número de monócitos aumenta, enquanto o de linfócitos diminui, em pacientes com COVID-19, em comparação com pacientes com influenza (YUN et al., 2020). Entretanto, um estudo conduzido por Sun *et al.* mostrou que há uma diferença significativa entre os pacientes com COVID-19 internados na unidade de terapia intensiva (UTI), que têm um menor número de monócitos, assim como de linfócitos, comparado aos pacientes com COVID-19 grave que não estão internados (SUN et al., 2020b). Em uma meta-análise, conduzida por Henry e colaboradores, foi confirmado que o número de neutrófilos é significativamente maior em pacientes com COVID-19 não sobreviventes, em comparação com os sobreviventes (HENRY et al., 2020). De acordo com as evidências atuais, o número de neutrófilos não apenas determina o prognóstico de COVID-19, mas também desempenha um papel importante na imunopatologia da COVID-19 grave.

Na série vermelha do hemograma, contagens de hemácias de pacientes com COVID-19 são relativamente mais baixas em comparação com o valor de referência normal, sendo mais prevalente em pacientes graves, sugerindo que a infecção por SARS-CoV-2 possa inibir significativamente a hematopoiese na medula óssea dos pacientes (YUAN et al., 2020). Um estudo realizado por Bellmann-Weiller e colaboradores analisou dados de 259 pacientes com COVID-19 e descreveu que a anemia é prevalente em pacientes com COVID-19 grave e está associada a um desfecho desfavorável (BELLMANN-WEILER et al., 2020).

Além disso, os pacientes que precisam de internação hospitalar na UTI, normalmente, apresentam uma diminuição em seus níveis de hemoglobina (FAN et al., 2020). Isso ocorre provavelmente pois uma das proteínas não estruturais do SARS-CoV-2, a ORF8, e as glicoproteínas de superfície da hemoglobina se ligam à porfirina, um subproduto oxidado originado durante o processo de biossíntese do grupamento heme, que têm como alvo o heme na cadeia 1-beta da hemoglobina, interferindo com a via anabólica desse metabolismo. Assim, os efeitos inibitórios dessas proteínas na hemoglobina podem ser uma razão para a rápida dessaturação, resultando em baixos níveis de hemoglobina no sangue (WENZHONG; HUALAN, 2020). Também já foi observado que pacientes com COVID-19 apresentam o volume corpuscular médio (VCM) elevado e a concentração da hemoglobina corpuscular média reduzida, dentro da faixa normal dos valores de referência (MAO et al., 2021). Em contrapartida, um estudo realizado com 1.327 pacientes no maior hospital de Wuhan, cidade originária do SARS-CoV-2, reportou que os pacientes sintomáticos com COVID-19 apresentavam menor VCM e hemoglobina corpuscular média (HCM), em comparação aos pacientes assintomáticos (LU et al., 2021). Ademais, já foi observado que uma alta variação do tamanho das hemácias está associada a um risco alto de morbidade e mortalidade na COVID-19, principalmente, em pacientes com menos de 70 anos, e pode ser utilizado como um preditor de mortalidade (HIGGINS et al., 2020; LORENTE et al., 2021). Em comparação com os casos moderados, os casos graves de COVID-19, normalmente, apresentam menores níveis de hemoglobina e número de hemácias, bem como maior amplitude de distribuição de hemácias (*Red cell distribution width* - RDW) (TANERI et al., 2020). Também já foram observados níveis de hemoglobina, hematócrito e de hemácias mais baixos em pacientes com comorbidades, que podem ser explicados pela incapacidade da medula óssea de produzir hemácias suficientes para transportar oxigênio e pelos danos pulmonares induzidos pelo COVID-19, dificultando a troca gasosa (DJAKPO et al., 2020).

Já foi observado que a quantidade de basófilos é menor durante a doença aguda em relação à fase de recuperação de COVID-19, significando que existe uma tendência à basopenia em pacientes com COVID-19 (MURDACA et al., 2021a). Em uma coorte de 135 pacientes com COVID-19, Lucas e colaboradores

(2020) descreveram que o aumento de monócitos, neutrófilos e eosinófilos se correlacionaram com a gravidade da doença. Os eosinófilos se apresentam aumentados em pacientes com doença grave e permaneceram mais altos do que em pacientes com doença moderada (LUCAS et al., 2020). Em contrapartida, em um estudo realizado com 97 pacientes admitidos no Centro Clínico de Saúde Pública de Shanghai, 71% dos pacientes tiveram uma diminuição nos eosinófilos circulantes. Os pacientes com baixo número de eosinófilos na admissão hospitalar eram mais propensos a ter febre, fadiga e falta de ar, com mais lesões na tomografia de tórax e agravamento radiográfico, e maior tempo de internação hospitalar e curso da doença, comparado com aqueles com contagens de eosinófilos normais. Assim, de acordo com esse estudo, o número de eosinófilos do sangue periférico pode ser um indicador eficaz e eficiente no diagnóstico, avaliação e monitoramento do prognóstico do paciente COVID-19, a ainda melhor se combinado com o NLR (XIE et al., 2021). De forma similar, em um estudo com 85 casos fatais de COVID-19, quase todos os pacientes apresentavam número total de eosinófilos reduzido no sangue periférico, abaixo da média normal (DU et al., 2020). Em 2021, Mao e colaboradores relataram que eosinopenia, monocitose, linfopenia e anemia eram comuns entre os pacientes convalescentes de COVID-19 (MAO et al., 2021). Além disso, o número de granulócitos imaturos já foi proposto como um preditor de sepse e um marcador de síndrome respiratória aguda grave (AYRES; SGNAOLIN; MUNHOZ, 2019; HUANG et al., 2019). Na COVID-19, um baixo número de granulócitos imaturos é observado em todos os pacientes, tornando esse parâmetro um marcador de diagnóstico de desempenho médio e um bom preditor de progressão para doença crítica (MYARI; PAPAPETROU; TSAOUSI, 2021).

Na série plaquetária, já foi observado que os pacientes com COVID-19 apresentam aumento do volume plaquetário médio e hiperatividade plaquetária, que se correlaciona com uma diminuição no número total de plaquetas (ZHANG et al., 2020). O volume plaquetário médio é frequentemente aumentado em pacientes com COVID-19 grave, especialmente naqueles com maior risco de morte, e pode ser um marcador confiável de gravidade da doença (LIPPI; HENRY; FAVALORO, 2021). A trombocitopenia, ou seja, diminuição do número das plaquetas, é uma das manifestações clínicas mais comuns em pacientes com COVID-19 e está

associada a um risco aumentado de mortalidade (YANG et al., 2020b). Além disso, apesar de não serem obtidas pelo exame do hemograma completo, as dosagens do dímero-D, produto de degradação da fibrina na cascata de coagulação, e da proteína C reativa, proteína sintetizada pelo fígado cujos níveis aumentam em resposta à inflamação, já foram observadas como mais altas na COVID-19 em comparação com indivíduos saudáveis, e estão positivamente correlacionadas com a gravidade da doença, sugerindo uma maior taxa de coagulação e inflamação nesses pacientes (ELSHAZLI et al., 2020a; YUAN et al., 2020).

1.6. Curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para a Validação de Biomarcadores e Preditores de Desfecho

O termo “biomarcador” refere-se a uma ampla subcategoria de sinais médicos que podem ser medidos com precisão e que tenham reprodutibilidade, geralmente usados como uma ferramenta de diagnóstico, avaliação ou predição do desfecho de uma determinada doença em pesquisas médicas. Exemplos de biomarcadores incluem desde pulso e pressão sanguínea, até testes laboratoriais mais complexos de sangue e outros tecidos (HSU; CHANG; HSUEH, 2014; STRIMBU; TAVEL, 2010).

Os biomarcadores desempenham um papel importante no tratamento, prognóstico e gerenciamento de doenças de diferentes maneiras, na qual espera-se prever o resultado clínico com base em evidências epidemiológicas, terapêuticas, fisiopatológicas ou outras evidências científicas. (CHEN; HUANG; KERR, 2011). Assim, para validar um biomarcador, é necessário analisar a sua capacidade de discriminar entre um indivíduo doente e um indivíduo saudável. Para isso, pode ser utilizada a acurácia, métrica para avaliar modelos de classificação definida pelo número de predições corretas dividida pelo número total de predições, ou seja, virtualmente é medida pela sensibilidade e especificidade. Dado um classificador e uma instância, existem quatro resultados possíveis. Se a instância for positiva e for predita e classificada como positiva, ela será considerada como um verdadeiro positivo; se for classificada como negativa, será considerada como falso negativo. Se a instância for negativa e for predita e classificada como negativa, ela será considerada como um negativo verdadeiro; se for classificada como positiva, será considerada como falso positivo.

(FAWCETT, 2006). A partir disso, a sensibilidade, que corresponde à taxa de verdadeiros positivos, é a capacidade de um teste ou biomarcador de classificar corretamente um indivíduo como “doente”. Já a especificidade, taxa de verdadeiros negativos, se refere à capacidade de um teste ou biomarcador de classificar corretamente um indivíduo saudável. Assim, a sensibilidade e a especificidade são inversamente proporcionais, o que significa que, geralmente, à medida que a sensibilidade aumenta, a especificidade diminui e vice-versa. (PARIKH et al., 2008). Idealmente, é desejável que um biomarcador tenha alta sensibilidade e alta especificidade para uma previsão precisa (HSU; CHANG; HSUEH, 2014). Para serem úteis clinicamente, os testes para biomarcadores devem ter alta acurácia preditiva e serem facilmente mensuráveis e reproduzíveis, minimamente invasivos e aceitáveis para pacientes e médicos (SRIVASTAVA; GOPAL-SRIVASTAVA, 2002).

A curva ROC (*receiver operating characteristic*) é a ferramenta gráfica bidimensional mais utilizada para avaliar a acurácia e o poder diagnóstico de um biomarcador, visto que fornece informações sobre a relação entre a sensibilidade e a especificidade deste (HSU; CHANG; HSUEH, 2014). Essa curva é criada plotando-se a sensibilidade (verdadeiro positivo) no eixo y contra $1 -$ especificidade (verdadeiro negativo) no eixo x para cada valor (HOO; CANDLISH; TEARE, 2017). Assim, quanto mais a curva ROC se aproxima do canto superior esquerdo, melhor é a qualidade do teste quanto à capacidade de discriminar os grupos. Além disso, a linha de referência diagonal da curva ROC representa uma região de aleatoriedade do teste, incapaz de classificar tanto os doentes quanto os saudáveis, visto que nessa região a sensibilidade é igual à especificidade (**Fig. 4**).

Além da análise dos pontos da curva propriamente dita, o indicador de dimensão do efeito para as curvas ROC mais empregado é a área sob a curva [*area under the curve* (AUC)]. AUC é o resultado da integração de todos os pontos durante o trajeto da curva e computa, simultaneamente, a sensibilidade e a especificidade, sendo uma forma eficaz de resumir a acurácia diagnóstica geral do biomarcador (POLO; MIOT, 2020). Ela assume valores de 0 a 1, em que um valor de 0 indica um teste perfeitamente impreciso e um valor de 1 reflete um teste perfeitamente preciso. Em geral, uma AUC de 0,5 não é capaz de diagnosticar pacientes com e sem a doença com base no teste; 0,6 a 0,7 é considerado um valor ruim; 0,7 a 0,8 é considerado aceitável; 0,8 a 0,9 é considerado excelente; e

acima de 0,9 é considerado excepcional (MANDREKAR, 2010; NAHM, 2022) (**Tabela 1**). A AUC reflete a acurácia global do biomarcador, ou seja, uma estimativa da probabilidade de classificação correta de um indivíduo ao acaso. Por exemplo, uma curva ROC com AUC de 0,89 sugere uma probabilidade de classificação correta de 89% dos casos. Por outro lado, uma AUC de 0,5, assume-se que o biomarcador atribua aleatoriamente um paciente como normal ou como doente.

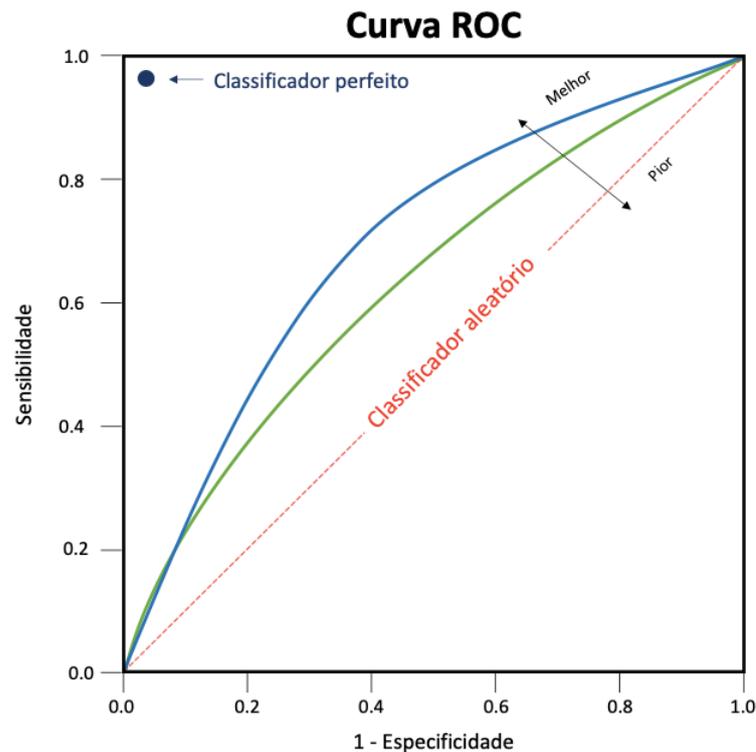


FIGURA 4. Exemplo e explicação da curva ROC. O eixo y do gráfico é representado pela sensibilidade, enquanto o eixo x é representado por 1 – especificidade. As curvas com maior área sob a curva (AUC) são consideradas melhores na predição, enquanto as curvas com menor AUC são consideradas piores na predição. A curva exatamente na diagonal é considerada um classificador aleatório, visto que classifica 50% de forma correta e 50% de forma errada.

TABELA 1. Interpretação do valor da Área Sob a Curva (AUC) da curva ROC

| Área Sob a Curva (AUC) | Interpretação |
|--------------------------------|---------------|
| $0,9 \leq \text{AUC}$ | Excepcional |
| $0,8 \leq \text{AUC} \leq 0,9$ | Excelente |
| $0,7 \leq \text{AUC} \leq 0,8$ | Aceitável |
| $0,6 \leq \text{AUC} \leq 0,7$ | Ruim |
| $0,5 \leq \text{AUC} \leq 0,6$ | Falho |

Interpretação da curva ROC baseada em Mandreka *et al.* e Nahm *et al.* Para que um teste diagnóstico seja significativo, a AUC deve ser superior a 0,5. Geralmente uma AUC $\geq 0,8$ é considerada excelente (MANDREKAR, 2010; NAHM, 2022).

A curva TG-ROC (*two-graph receiver operating characteristic*) é um complemento para a curva ROC que permite visualizar as curvas de sensibilidade e especificidade em um único gráfico (REICHENHEIM, 2002). A análise gráfica TG-ROC permite encontrar o valor do ponto de corte (*cutoff value*) associado com a combinação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade, de acordo com a necessidade: mais ou menos especificidade ou sensibilidade. Em uma triagem de pacientes, por exemplo, deve-se priorizar a sensibilidade, visto que é melhor ter um falso positivo do que um falso negativo. Entretanto, essas proporções variam de acordo com cada situação e devem ser ajustados para atender a funcionalidade de cada teste ou biomarcador. Desta forma, a acurácia do teste de diagnóstico deve selecionar um valor de corte (*cutoff value*) ótimo que permite discriminar indivíduos doentes e não doentes (sadios) com características operacionais definidas (MARIA DA SILVA; LOPES; IV, 2009) (**Fig. 5**).

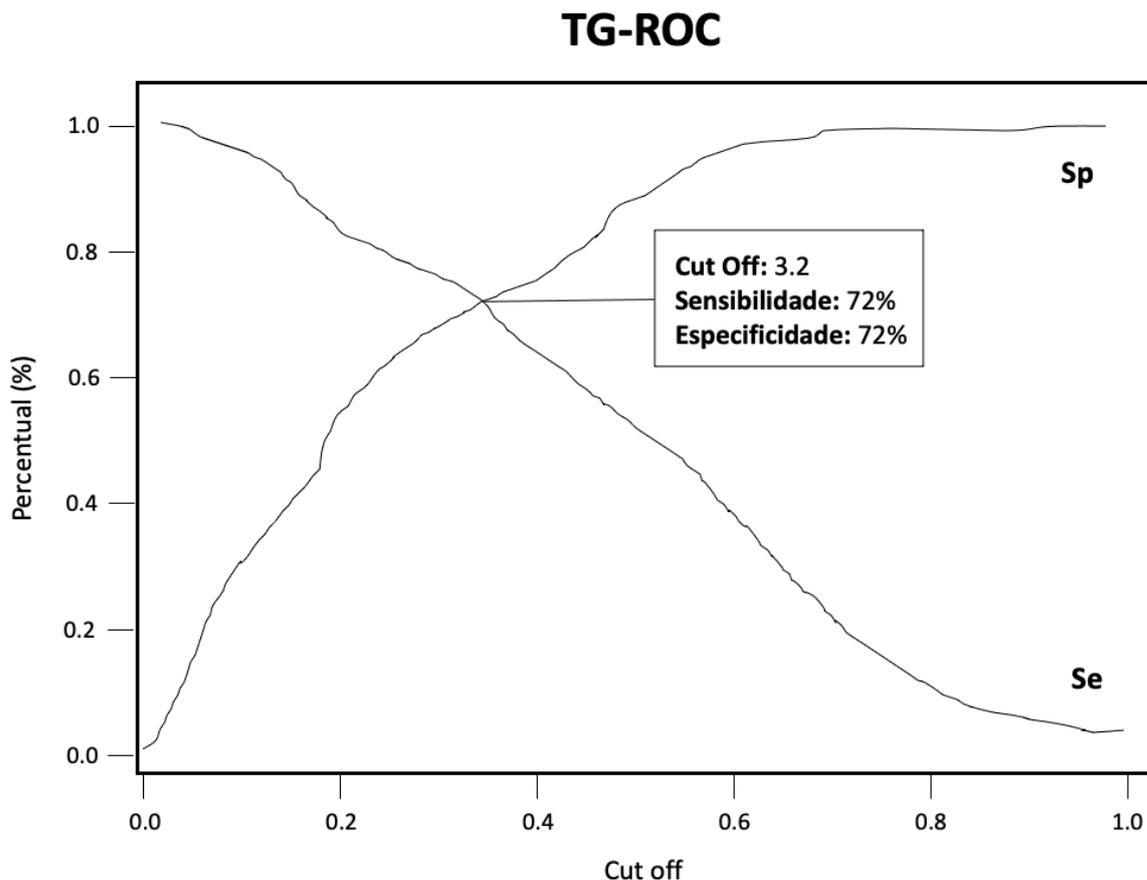


FIGURA 5. Exemplo de curva TG-ROC. Curva TG-ROC com ambas a sensibilidade (Se) (72%) e a especificidade (Sp) (72%), no qual o ponto de corte (cut off) é de 3,2. O ponto de corte, nesse caso, é determinado pelo momento de maior valor simultâneo de sensibilidade e especificidade.

1.7. Árvore de Decisão para Classificação e Regressão de Variáveis

As árvores de decisão são algoritmos de aprendizado supervisionados não paramétricos que são utilizados para tarefas de classificação e regressão. O objetivo desse modelo é prever o valor de uma variável de destino com base em diversas variáveis de entrada. Em uma análise da árvore de classificação, o resultado previsto é a classe (discreta) a qual os dados pertencem: por exemplo, os pacientes com COVID-19 são classificados nas classes Leve ou Grave. Enquanto isso, em uma análise de uma árvore de regressão, o resultado previsto pode ser considerado um número real (contínuo): por exemplo, o tempo de internação de um paciente em um hospital.

As árvores de decisão, em geral, são estruturas de dados formadas por um conjunto de elementos que armazenam informações chamadas de “nós”. O nó raiz está presente no início da árvore e possui o maior nível hierárquico, fazendo ligações com outros nós, denominados filhos. Esses filhos, chamados de nós de

decisão, podem possuir seus próprios filhos que, por sua vez, também possuem os seus. O nó que não possui filho é denominado nó folha ou nó terminal, que representa a decisão a ser tomada. Em uma árvore de decisão, uma decisão é tomada por meio do caminho a partir do nó raiz até o nó folha (TAHA JIJO; MOHSIN ABDULAZEEZ, 2021). A árvore de decisão oferece muitos benefícios para a mineração de dados, como: a fácil compreensão pelo usuário final, a capacidade de lidar com uma variedade de dados de entrada (nominal, numérico e textual), a capacidade de processar conjuntos de dados incorretos ou valores ausentes, seu alto desempenho com pequeno número de esforços, entre outros (BHARGAVA et al., 2013). Assim, esse tipo de análise pode ser exibido graficamente de maneira fácil, se tornando simples de entender e interpretar (**Fig. 6**).

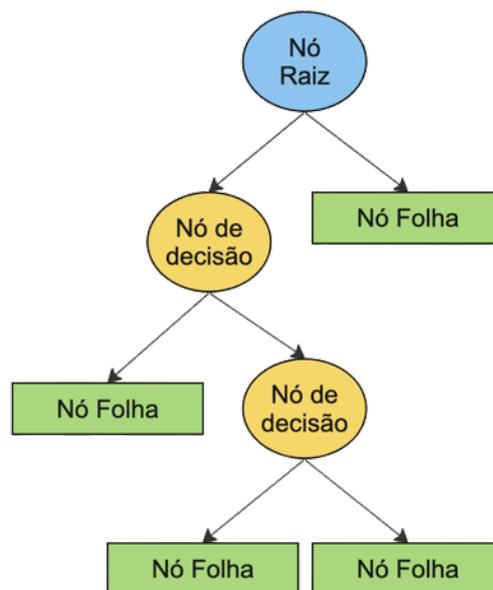


FIGURA 6. Representação de uma árvore de decisões com nó raiz, nós de decisão e nós folha. Os nós de decisão representam decisões a serem tomadas e os nós folhas representam os possíveis resultados dessas escolhas.

Quando se cria um modelo de aprendizado de máquina, é uma prática padrão para validar a sua metodologia não incluir uma parte de seus dados como um conjunto-teste. Uma prática comum de uma divisão de treinamento é a divisão 80:20, na qual se usa 80% dos dados e se retêm os 20% restantes para testar o modelo. Entretanto, a validação cruzada *Leave-One-Out* (LOOCV) é a maneira mais robusta de estimar o desempenho de algoritmos de aprendizado de máquina

e testar um modelo que contém dados a nível de cada participante. Semelhante à abordagem do conjunto de validação, o LOOCV envolve a divisão dos dados em um conjunto de treinamento e um conjunto de validação. Essa abordagem de validação cruzada utiliza cada pessoa individualmente como um conjunto-teste. Nessa validação cruzada, cada observação é considerada como o conjunto de validação e as observações restantes ($N - 1$) são consideradas como o conjunto de treinamento. Este processo é repetido para todas as observações de modo que N modelos sejam estimados. Por exemplo, se existem apenas três indivíduos em um conjunto de dados, o LOOCV validaria esse modelo pelo treinamento com duas pessoas e “deixaria de fora” a terceira pessoa. Isso se repete até que todos os três indivíduos tenham ficado de fora, fazendo com que o modelo seja validado com três grupos amostrais, ao invés de um. Assim se pontua usando uma métrica para avaliar a precisão ou os erros do modelo da árvore de decisão (WONG, 2015).

Tanto as ferramentas de Curva ROC e TG-ROC, quanto as árvores de decisão já são amplamente utilizadas para validar testes diagnósticos e biomarcadores. No próprio contexto da COVID-19, Aires *et al.* já demonstraram que a tromboelastometria, um teste viscoelástico capaz de avaliar a coagulação em tempo real a partir de amostras de sangue total, é útil para detectar a ativação da coagulação endógena em pacientes com COVID-19 grave e não grave. Com isso, por meio dessas ferramentas, foi observado que o índice de potencial tromboelastométrico é aumentado em pacientes graves e que parâmetros tromboelastométricos selecionados podem ser usados para separar pacientes graves de não graves com moderada a alta acurácia (AIRES *et al.*, 2022). Além disso, Toraih *et al.* utilizaram da análise da árvore de decisão para prever mortalidade e gravidade em pacientes com COVID-19, combinando marcadores cardíacos com características demográficas e clínicas (TORAIH *et al.*, 2020). Outro estudo, de Huyut *et al.*, utilizou do algoritmo de árvore de decisão para prever o prognóstico da COVID-19 por meio de parâmetros de gases sanguíneos, o que pode auxiliar no diagnóstico precoce da doença e no tratamento intensivo de pacientes graves (HUYUT; ÜSTÜNDAĞ, 2022).

Nossa hipótese do trabalho é que o hemograma completo, exame rotineiramente utilizado para avaliar a saúde geral do paciente, assim como para

detectar e monitorar uma ampla gama de distúrbios, incluindo anemia, infecções e leucemia, poderia ser utilizado para encontrar biomarcadores eficientes e de baixo custo utilizados para monitorar e prever a gravidade da COVID-19, visto que a infecção pode alterar diversos parâmetros hematológicos. Como o objetivo do nosso trabalho foi encontrar um biomarcador capaz não somente de monitorar, mas principalmente de prever o desfecho da doença, um aspecto importante dessas alterações hematológicas seria a precocidade de seu surgimento durante o curso da doença. A identificação de um biomarcador de prognóstico capaz de prever, ainda na fase aguda da doença, a propensão de pacientes com SARS-CoV-2 em desenvolver uma forma grave da doença pode permitir aos médicos triagem e tratamento mais eficientes dos pacientes (MARIAPPAN et al., 2021).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Investigar a possível associação entre parâmetros hematológicos e as diferentes formas da COVID-19, com o intuito de utilizá-los como preditores precoces do desfecho da doença.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a série vermelha, a série branca, a série plaquetária do hemograma e os respectivos índices hematológicos de pacientes com COVID-19 e indivíduos do grupo controle.
- Comparar os parâmetros que apresentem maior diferença entre os grupos entre os pacientes com COVID-19 leves, internados e progressão, para avaliar se esses índices possuem potencial de preditor do desfecho da doença.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade de parâmetros e índices hematológicos, identificando e estabelecendo os melhores preditores para discriminar as diferentes formas clínicas da COVID-19.
- Predizer parâmetros com potencial de predição de desfechos da COVID-19.

3. POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Recrutamento de Voluntários

O recrutamento de voluntários ocorreu durante a admissão dos indivíduos na UPA Centro Sul e Hospital Risoleta Tolentino Neves, em Belo Horizonte, Minas Gerais, instituições parceiras do estudo, entre 16 de novembro de 2020 e 16 de agosto de 2021. Todos os indivíduos foram testados usando amostras de *swabs* nasofaríngeos para RT-qPCR de SARS-CoV-2. Os participantes foram avaliados por exame clínico e laboratorial de rotina, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**). As amostras de sangue de cada indivíduo foram coletadas em tubos heparinizados de 10 mL por profissionais treinados, seguindo os protocolos de segurança e utilização de EPIs. O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), pela Comissão de Avaliação de Projetos de Pesquisa e Extensão (CAPPE) do Hospital Risoleta Tolentino Neves e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número CAAE: 40208320.3.1001.5149 (**Anexo 2**).

3.2. População de Estudo

As amostras de 297 indivíduos foram coletadas e os voluntários foram divididos em quatro grupos: Controle Negativo (n=51), Síndrome Gripal (n=94), COVID-19 Leve (n=101) e COVID-19 Internados (n=51) (**Tabela 2**). Os indivíduos do grupo Controle Negativo são pessoas não vacinadas para COVID-19, que não apresentavam nenhum tipo de sintoma gripal. Os pacientes do grupo Síndrome Gripal são aqueles indivíduos que apresentavam sintomas gripais, mas que receberam resultado negativo do RT-qPCR para SARS-CoV-2. Entretanto, não se sabe qual é a origem desses sintomas. Já os pacientes do grupo COVID-19 Leve são indivíduos com resultado positivo para o RT-qPCR para SARS-CoV-2, mas que apresentavam sintomas leves e não precisaram de internação hospitalar. Enquanto isso, os integrantes do grupo COVID-19 Internados são pacientes com resultado positivo para o RT-qPCR para SARS-CoV-2, com diagnóstico de COVID-19 moderada a grave, que necessitaram de internação. Entre os pacientes com COVID-19 internados, 9 indivíduos tiveram o sangue coletado antes da internação, quando os sintomas da doença ainda eram leves. Os critérios de exclusão de

participantes do estudo foram: indivíduos convivendo com HIV, indivíduos com menos de 18 anos de idade, indivíduos que apresentaram resultado inconclusivo no teste qRT-PCR para a detecção de SARS-CoV-2 e indivíduos vacinados com qualquer dose de imunizante contra COVID-19.

Como o objetivo do trabalho era identificar parâmetros preditivos do desfecho da doença no início dos sintomas, foram subdivididos, dentro dessa amostragem, os pacientes que tiveram o sangue coletado com 1 até 4 dias de sintomas (grupo COVID-19 fase aguda ou precoce), totalizando 152 pacientes (**Fig. 7**), daqueles que tiveram seu sangue coletado dentro de 5 –15 dias após o início dos sintomas, denominados de grupo COVID-19 fase tardia, totalizando 145 pacientes (**Fig. 8**). Dentro do total de 297 indivíduos, 9 desses tiveram o seu sangue coletado enquanto apresentavam sintomas leves, mas posteriormente necessitaram de internação hospitalar. Dessa forma, esses indivíduos foram classificados de acordo com o seu desfecho da doença (COVID-19 Internados), mas também foram analisados como um grupo separado (COVID-19 Progressão) para avaliar as habilidades preditivas dos parâmetros hematológicos.

TABELA 2. Características demográficas e clínicas dos voluntários incluídos no estudo.

| Características demográficas e clínicas do grupo de estudo | | | | | | | | | |
|--|--------------------------|-------------|-------------|---------------------|------------------|----------------|-------------------------------|-------------|----------------|
| Total (297) | | Sexo | | Idade | | | Comorbidade ou Doença Crônica | | |
| | | Masculino | Feminino | Adulto (18-59 anos) | Idoso (>60 anos) | Sem Informação | Sim | Não | Sem Informação |
| Controle Negativo (51) | | 19 (37,25%) | 32 (62,74%) | 48 (94,11%) | 3 (5,88%) | - | 19 (37,25%) | 30 (58,82%) | 2 (3,92%) |
| 1 – 4 dias de sintomas (fase inicial) | Síndrome Gripal (51) | 23 (45,09%) | 28 (54,90%) | 44 (86,27%) | 7 (13,72%) | - | 22 (43,13%) | 29 (56,86%) | - |
| | COVID-19 Leve (38) | 24 (63,15%) | 14 (36,84%) | 35 (92,10%) | 3 (7,89%) | - | 15 (38,47%) | 23 (60,52%) | - |
| | COVID-19 Internados (12) | 9 (75%) | 3 (15%) | 5 (41,66%) | 6 (50%) | 1 (8,33%) | 9 (75%) | 3 (15%) | - |
| 5 – 15 dias de sintomas (fase tardia) | Síndrome Gripal (43) | 17 (39,53%) | 26 (60,46%) | 36 (83,72%) | 7 (16,27%) | - | 22 (51,16%) | 21 (48,83%) | - |
| | COVID-19 Leve (63) | 26 (41,26%) | 37 (58,73%) | 48 (76,10%) | 15 (23,80%) | - | 31 (49,20%) | 32 (50,79%) | - |
| | COVID-19 Internados (39) | 24 (61,53%) | 15 (39,46%) | 9 (23,07%) | 30 (76,92%) | - | 19 (48,71%) | 20 (51,28%) | - |

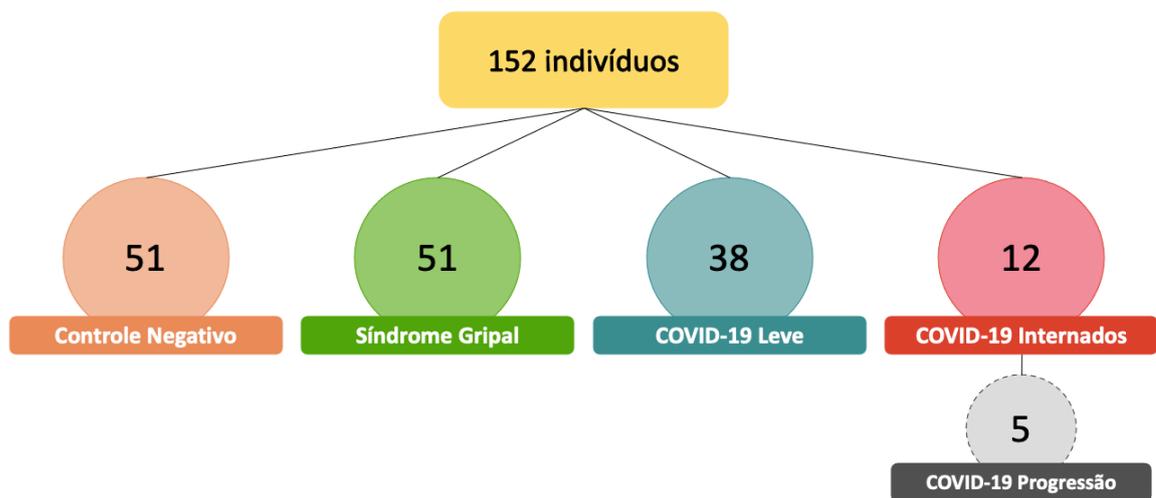


FIGURA 7. Esquema dos grupos com 1 a 4 dias de sintomas incluídos no estudo. Quando foi definido o grupo COVID-19 de fase precoce com o sangue coletado com 1-4 dias de sintomas, o grupo Controle Negativo permaneceu com número de participantes igual ao número original (n=51), mas os outros grupos tiveram uma diminuição no número amostral: Síndrome Gripal (n=50), COVID-19 Leve (n=38) e COVID-19 Internados (n=12). Dos 9 indivíduos que apresentaram sintomas leves quando tiveram o seu sangue coletado, mas posteriormente evoluíram para internação (Progressão da COVID-19), apenas 5 tiveram seu sangue coletado dentro de 1 a 4 dias após os sintomas. Nesse período, 3 indivíduos do grupo COVID-19 Internados foram a óbito.

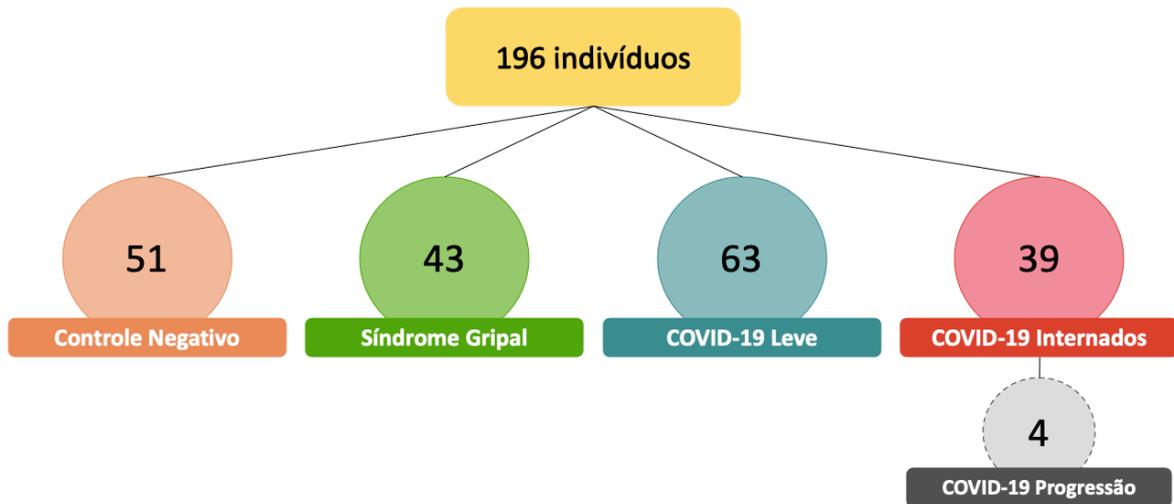


FIGURA 8. Esquema dos grupos com 5 a 15 dias de sintomas incluídos no estudo. Quando foi definido o grupo COVID-19 de fase tardia com o sangue coletado com 5 – 15 dias de sintomas, o grupo Controle Negativo permaneceu com número de participantes igual ao número original (n=51), enquanto os outros grupos apresentaram um número de amostras de: Síndrome Gripal (n=43), COVID-19 Leve (n=63) e COVID-19 Internados (n=39). Dos 9 indivíduos que apresentaram sintomas leves quando tiveram o seu sangue coletado, mas posteriormente evoluíram para internação (Progressão da COVID-19), apenas 4 tiveram seu sangue coletado dentro de 5 – 15 dias após os sintomas. Nesse período, 2 indivíduos do grupo COVID-19 Internados foram a óbito.

3.3. Hemograma Completo

Para realizar o hemograma, foram aliqüotados 300 µL de sangue total de cada paciente em microtubos de 500 µL e a análise do sangue foi realizada, utilizando os analisadores hematológicos automatizados *Bayer ADVIA 60 Hematology Analyzer inicialmente, e posteriormente o Sysmex XN-550*, devido à necessidade da troca do equipamento ao longo do estudo. Os equipamentos realizam o hemograma completo e informam o número de hemácias, volume de hemoglobina, porcentagem do hematócrito, volume corpuscular médio, quantidade de hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, amplitude de distribuição de hemácias, número de leucócitos, número e porcentagem de linfócitos, monócitos, granulócitos, número de plaquetas e volume plaquetário médio. O equipamento *Sysmex XN-550* é capaz ainda de discriminar granulócitos em basófilos, neutrófilos, eosinófilos e granulócitos imaturos, enquanto o *Bayer ADVIA 60 Hematology Analyzer* não discrimina essas subpopulações. Dessa forma, algumas amostras dos indivíduos apresentaram análise diferencial total de leucócitos e outras apresentaram a análise diferencial em três partes apenas (granulócitos, linfócitos e monócitos). No entanto, ambos os

analisadores foram equivalentes em suas medidas, sendo viável comparar seus resultados entre si. O *Sysmex XN-550* é um modelo mais atual e mais sensível a todos os parâmetros, portanto, ainda são comparáveis aos valores obtidos no *Bayer ADVIA 60 Hematology Analyzer*, especialmente, quando incluídos em razões como o GLR e o PLR. O número de amostras processadas em cada equipamento está representado no **Anexo 3**.

3.4. Análises Estatísticas

Utilizando os resultados do hemograma completo, foram realizadas análises estatísticas empregando o software *GraphPad Prism 8.0* para comparar os parâmetros hematológicos entre os grupos Controle Negativo, Síndrome Gripal, COVID-19 Leve e COVID-19 Internados. A distribuição normal de nossas amostras foi analisada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk, dependendo do número de indivíduos em cada grupo. Como se tratava de 4 grupos de dados não paramétricos, ou seja, que não possuíam distribuição Gaussiana, e não pareados, os testes estatísticos de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram usados para identificar correlações entre os dados do hemograma e a gravidade da doença. Os indivíduos considerados *outliers* pelo teste ROUT (Q = 1%) foram removidos das análises. A diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0,05$ e nos gráficos, os valores de p estão representados por asteriscos, segundo poder de significância (**Tabela 3**). Os valores de referência dos parâmetros hematológicos utilizados nos gráficos foram retirados da 12ª edição do livro "Practical Hematology" de Dacie e Lewis (**Tabela 4**).

As curvas *Receiver Operating Characteristics* (ROC), bem como as curvas *Two-Graph-ROC* (TG-ROC), também foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 8.0*. Os parâmetros da curva ROC foram usados para definir a acurácia global de cada preditor hematológico, definida pela área sob a curva (AUC). Os valores de corte foram selecionados de acordo com a maior sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) em cada gráfico. Posteriormente, os valores de corte foram arredondados para números inteiros.

As árvores de decisão foram construídas usando o software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, versão 3.6.11, University of Waikato, Nova Zelândia) para classificar pacientes com Controle Negativo, Síndrome Gripal e COVID-19 com base em PLR, GLR e MON%, bem como para classificar os desfechos de COVID-19 (leve ou hospitalizado) com base em GLR e MON%. A validação cruzada *leave-one-out* (LOOCV) foi aplicada para estimar a acurácia da classificação e testar a generalização do modelo.

TABELA 3. Representação dos valores de p por asteriscos

| Valores de p | |
|--------------|----------|
| ns | p>0.05 |
| * | p≤0.05 |
| ** | p≤0.01 |
| *** | p≤0.0001 |
| **** | p<0.0001 |

Diferentes valores de p e suas representações nos gráficos em asteriscos (*, **, *** e ****), segundo poder de significância estatística.

TABELA 4. Valores de referência dos parâmetros hematológicos

| Valores de Referência | |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Volume Corpuscular Médio (fL) | 83 – 101 |
| Granulócitos (/L) | 2 – 7.6 x 10 ⁹ |
| Linfócitos (/L) | 1,0 – 3,0 x 10 ⁹ |
| Linfócitos (%) | 20% – 40% |
| Monócitos (%) | 2% – 10% |
| Plaquetas (/L) | 150 – 410 x 10 ⁹ |

Valores de referência dos parâmetros hematológicos avaliados pelos analisadores hematológicos automatizados *Sysmex XN-550* e *Bayer ADVIA 60 Hematology Analyzer* de acordo com a 12^a edição do livro "*Practical Hematology*" de Dacie e Lewis.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações hematológicas em pacientes com 1 – 4 dias de sintomas são capazes de diferenciar as formas clínicas de COVID-19

Para avaliar as diferenças dos parâmetros hematológicos entre os grupos Controle Negativo, Síndrome Gripal, COVID-19 Leve e COVID-19 Internados nos primeiros dias de sintomas, o sangue de cada indivíduo foi analisado por analisadores hematológicos automatizados. Durante a execução do trabalho, foram realizadas as análises de todos os parâmetros hematológicos fornecidos pelos analisadores hematológicos entre os quatro grupos. Entretanto, neste documento, apresentaremos apenas as análises dos parâmetros que apresentaram diferenças envolvendo os grupos COVID-19. As análises de parâmetros que apresentaram apenas diferenças entre os grupos Síndrome Gripal e Controle Negativo ou diferenças que não foram exclusivas para o grupo COVID-19 (Leve e Internado) não foram incluídas, visto que o foco do projeto é identificar marcadores exclusivos da infecção pelo SARS-CoV-2 e suas diferentes manifestações clínicas.

Analisando o grupo de indivíduos com 1 – 4 dias de sintomas, foi possível observar que a porcentagem de monócitos (MON%) foi capaz de diferenciar os pacientes com COVID-19 leve dos graves, visto que o grupo COVID-19 Leve apresentou uma porcentagem maior do que todos os outros grupos, ultrapassando inclusive os valores de referência (**Fig. 9 A**). Observamos que a diminuição do percentual e número de linfócitos estava presente em todos os pacientes com COVID-19 quando comparados com indivíduos dos outros grupos. Entretanto, durante essa fase aguda inicial, os perfis encontrados para os linfócitos e granulócitos ainda não são suficientes para diferenciar as formas clínicas da COVID-19. Apesar de aparentar existir uma diferença entre o número de linfócitos dos pacientes do grupo leve e do grupo internados, essa diferença não é estatisticamente significativa, provavelmente devido ao número de indivíduos analisados. No entanto, utilizando uma proporção capaz de comparar os dois parâmetros juntos, como a razão de granulócitos para linfócitos, é possível diferenciar pacientes com COVID-19 leve de pacientes com COVID-19 que foram hospitalizados nesse período (**Fig. 9 B, C, D e E**). Portanto, na fase inicial da

doença, durante os primeiros dias de sintomas, o GLR e a MON% mostram-se com alterações mais significativas do que a linfopenia, que é descrita como um biomarcador clássico da doença. Além disso, a razão de plaquetas por linfócitos (PLR), definida como o número absoluto de plaquetas dividido pelo número absoluto de linfócitos, foi capaz de diferenciar os pacientes com COVID-19 (tanto leve quanto hospitalizados) do grupo Controle Negativo e pacientes com Síndrome Gripal (**Fig. 9 E**), se tornando um potencial parâmetro para diagnóstico da COVID-19. Ademais, fica evidente que os pacientes que foram a óbito apresentaram menor percentual de monócitos, assim como maiores valores de GLR e PLR.

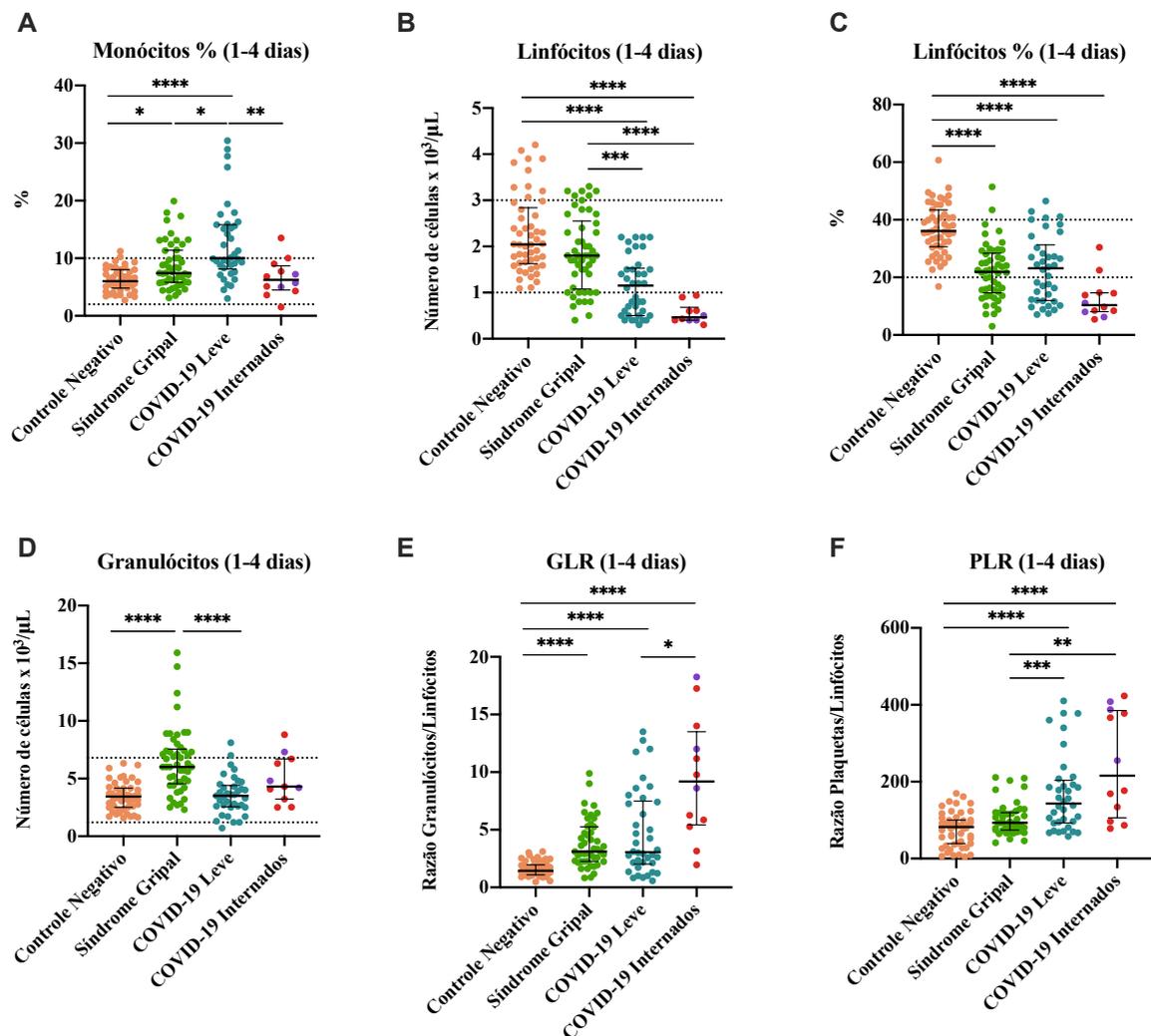


FIGURA 9. Análise hematológica de indivíduos com 1 – 4 dias de sintomas. A) Porcentagem (%) de monócitos; **B)** Número absoluto de linfócitos x 10³/μL; **C)** Pocercentage (%) de linfócitos; **D)** Número absoluto de granulócitos x 10³/μL; **E)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR); **F)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) dos grupos Controle Negativo, Síndrome Gripal, COVID-19 Leve e COVID-19 Internados com 1 – 4 dias de sintomas. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Cada grupo é representado com a sua mediana e intervalo interquartil em gráficos de dispersão de pontos. As

linhas pontilhadas indicam os valores de referência mínimos e máximos de cada parâmetro baseado no livro “*Practical Haematology – Dacie and Lewis*”, 2017. Pacientes que foram a óbito estão representados como pontos roxos nos gráficos. As diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas por linhas para valores de $p < 0,05$.

4.2. Alterações hematológicas clássicas da COVID-19 geralmente aparecem dentro de 5 – 15 dias após o início dos sintomas

Para verificar se essas mesmas alterações hematológicas estão presentes após os 5 primeiros dias de infecção, analisamos pacientes que tiveram seu sangue coletado dentro de 5 a 15 dias de sintomas. Nesse grupo, foi possível observar alterações hematológicas classicamente descritas na COVID-19, como a linfopenia e alterações no número de granulócitos. A porcentagem de monócitos aumenta a diferença entre os grupos COVID-19 Leve e Internados (**Fig. 10 A**), sendo capaz de melhor diferenciar esses dois grupos. Há uma diminuição considerável no número total de linfócitos em pacientes com COVID-19 em relação aos outros grupos, com uma diminuição ainda maior no percentual de linfócitos nos pacientes internados, o que possibilita a diferenciação desse grupo de indivíduos com COVID-19 leve (**Fig. 10 B e C**). Nesse período, o número de granulócitos dos pacientes com COVID-19 que foram hospitalizados apresentam-se elevados, em comparação com os dos pacientes com COVID-19 com sintomas leves (**Fig. 10 D**). Além dessas alterações, também observamos diferenças entre as duas formas clínicas da COVID-19 na análise de dois parâmetros conjuntos: a razão entre o número absoluto de granulócitos e o número absoluto de linfócitos (GLR) e a razão do número absoluto de plaquetas pelo número absoluto de linfócitos (PLR). Foi observado um aumento do GLR nos pacientes com COVID-19 que foram internados, em relação aos pacientes com a forma leve da doença, com uma diferença ainda maior do que pacientes com 1 – 4 dias de sintomas (**Fig. 10 E**). Já o PLR foi capaz de diferenciar ambas as formas clínicas de COVID-19 do Controle Negativo, mas não dos pacientes com Síndrome Gripal, como acontece nos primeiros 4 dias de sintomas (**Fig. 10 F**).

Os parâmetros VCM e $LYM*PLT$ apresentaram diferença entre o grupo COVID-19 Leve e Internados, com $p \leq 0.05$ e $p \leq 0.01$, respectivamente, nos pacientes com o sangue coletado de 5 – 15 dias, porém não foram apresentados pois não apresentaram nenhuma outra diferença estatisticamente significativa nas análises subsequentes. O volume corpuscular médio das hemácias (VCM) apresentou-se

menor em pacientes internados, quando comparados com os pacientes com sintomas leves. E foi observada uma diminuição no produto de $LYM \cdot PLT$ nos pacientes com COVID-19 Internados, em relação aos pacientes com a forma leve da doença.

Portanto, nossos dados confirmam e corroboram as informações já presentes na literatura. Em casos mais graves da doença, observamos uma linfopenia, acompanhada do aumento de granulócitos, concomitante com uma diminuição na porcentagem de monócitos. Porém, observamos que os perfis são diferentes em diferentes dias de sintomas. Por isso, para realizar o prognóstico precoce da doença não basta levar em conta apenas os aspectos que aparecem de forma mais robusta com 5 – 15 dias de sintomas, mas deve-se observar com cautela as alterações presentes nos 4 primeiros dias de sintomas, que muitas vezes só se mostram estatisticamente significativas quando aplicadas em razões de mais de um parâmetro, por exemplo.

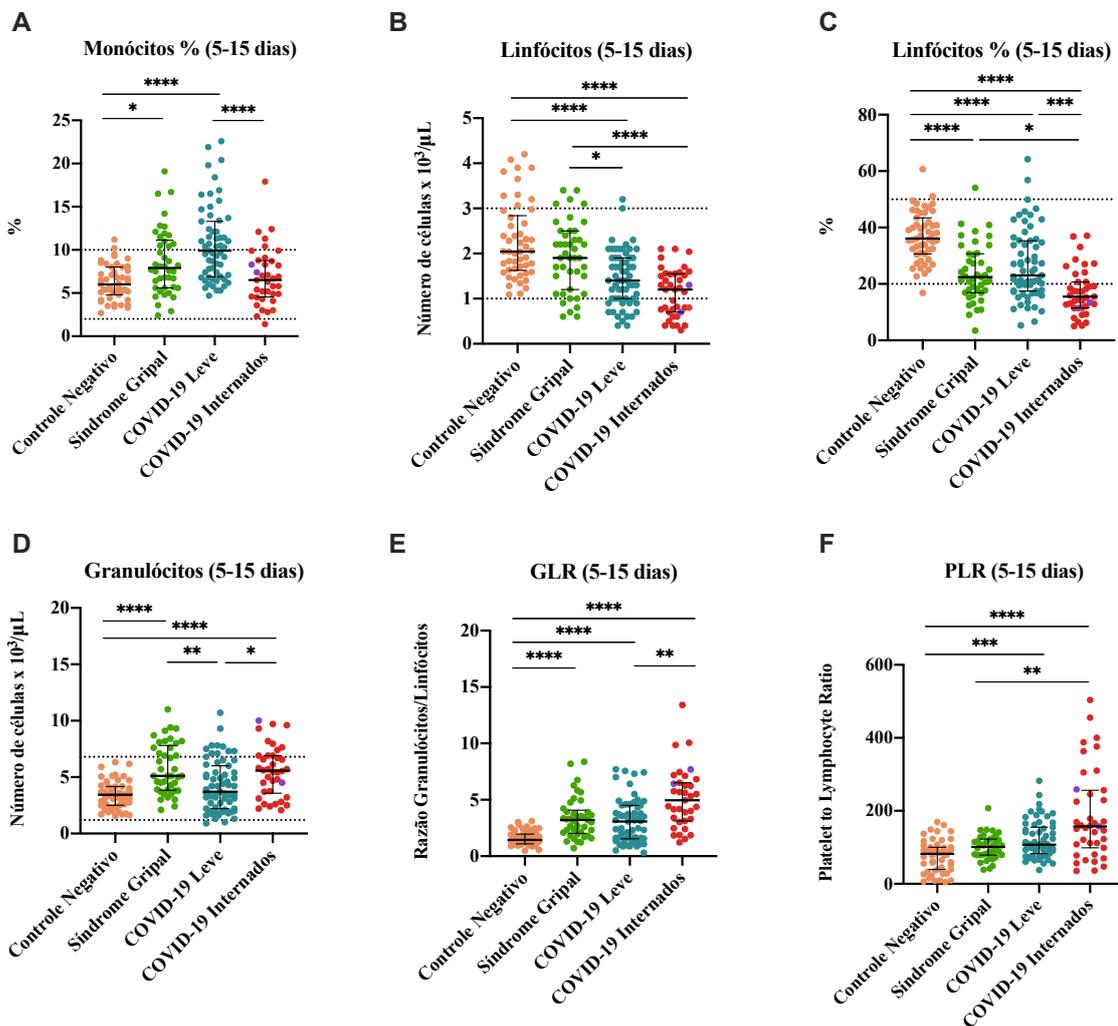


FIGURA 10. Análise hematológica de indivíduos controle negativos ou com COVID-19 com 5 – 15 dias de sintomas. A) Porcentagem (%) de monócitos; B) Número absoluto de linfócitos x $10^3/\mu\text{L}$; C) Porcentagem (%) de linfócitos; D) Número absoluto de granulócitos x $10^3/\mu\text{L}$; E) Razão de granulócitos por linfócitos (GLR); F) Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) dos grupos Controle Negativo, Síndrome Gripal, COVID-19 Leve e COVID-19 Internados com 5 – 15 dias de sintomas. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Cada grupo é representado com a sua mediana e intervalo interquartil em gráficos de dispersão de pontos. As linhas pontilhadas indicam os valores de referência mínimos e máximos de cada parâmetro baseado no livro “*Practical Haematology – Dacie and Lewis*”, 2017. Pacientes que foram a óbito estão representados como pontos roxos nos gráficos. As diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas por linhas para valores de $p < 0,05$.

4.3. MON% e GLR podem ser utilizados como preditores da necessidade de internação hospitalar

Para verificar se essas alterações hematológicas podem ser utilizadas como preditores, avaliamos os parâmetros que foram capazes de melhor diferenciar as formas clínicas de COVID-19 entre os grupos COVID-19 Leve e COVID-19 Internados (MON% e GLR), ou grupos COVID-19 dos controles negativos e indivíduos com síndrome gripal (PLR), com o grupo COVID-19 Progressão. Esse último grupo é composto por pacientes que tiveram suas amostras de sangue coletadas ainda quando apresentavam sintomas leves, mas posteriormente progrediram para a forma grave da doença, necessitando de internação hospitalar. Dessa forma, ao avaliar o grupo COVID-19 Progressão, é possível avaliar se essas alterações sanguíneas já estão presentes antes dos pacientes evoluírem para um quadro mais grave. As análises foram realizadas em dois períodos de tempo: em pacientes com sangue coletado entre 1 – 4 dias de sintomas e, então, entre 5 – 15 dias de sintomas. Isso permitiu avaliar se os pacientes que evoluíram para internação após recrutamento e se a coleta de amostras já apresentava índices hematológicos semelhantes aos pacientes já internados.

Observamos que, nos primeiros 4 dias de sintomas, a porcentagem de monócitos em pacientes com COVID-19 leve foi maior do que em pacientes com COVID-19 leve que evoluíram para hospitalização (COVID-19 Progressão). Significando que, desde os primeiros dias de sintomas, os pacientes que progrediram para a forma grave da doença já apresentavam um perfil das porcentagens de monócitos semelhante aos pacientes que estavam inicialmente internados. Nos 5 – 15 dias de sintomas, essa diferença desaparece, sendo apenas notável uma diferença entre as porcentagens do grupo COVID-19 Leve e

Internados, mas acreditamos ser devido a um número amostral muito pequeno (**Fig. 11 A e B**). Ao investigar as razões hematológicas, os pacientes com 1 – 4 dias de sintomas do grupo COVID-19 Leve apresentaram um GLR menor do que os pacientes dos grupos COVID-19 Progressão. Na análise de 5 – 15 dias essa diferença permanece e os pacientes do grupo COVID-19 Internados também apresentam diferenças com o grupo COVID-19 Leve. Nesse caso, os pacientes do grupo COVID-19 Progressão já apresentam altos valores de GLR, semelhante aos pacientes internados, antes de desenvolverem a forma grave da doença (**Fig. 11 C e D**). Em relação ao PLR, em 1 – 4 dias de sintomas não foi observada diferença entre os grupos. Já na análise de 5 – 15 dias de sintomas, os pacientes do grupo COVID-19 Internados apresentaram valores maiores de PLR do que os pacientes do grupo COVID-19 Leve (**Fig. 11 E e F**). Isso era esperado, visto que o PLR era um bom diferenciador entre controles negativos e pacientes com sintomas semelhantes aos da gripe dos grupos COVID-19, e não entre as formas clínicas da doença. Ademais, todos os pacientes que foram a óbito no grupo de progressão da COVID-19 apresentaram uma porcentagem menor de monócitos e valores mais altos de GLR, sugerindo que esses parâmetros podem de fato indicar um desfecho mais grave da doença.

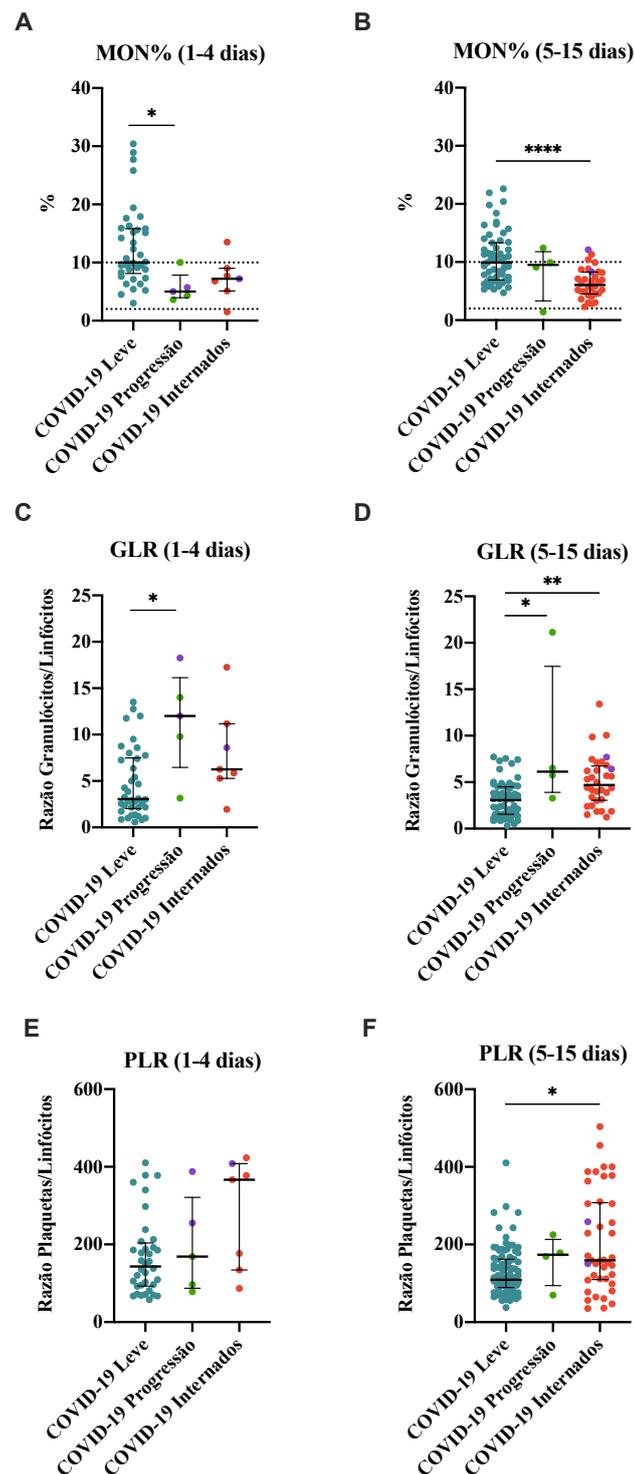


FIGURA 11. Comparação da análise hematológica de COVID-19 Leve, Internados e Progressão. Comparação da análise hematológica de indivíduos que apresentavam sintomas leves quando tiveram o seu sangue coletado, mas posteriormente progrediram para a internação hospitalar (COVID-19 Progressão), com o grupo COVID-19 Leve e com o grupo COVID-19 internados. **A)** Porcentagem (%) de monócitos (5 – 15 dias); **B)** Porcentagem (%) de monócitos (1 – 4 dias); **C)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR) (5 – 15 dias); **D)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR) (1 – 4 dias); **E)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) (5 – 15 dias); **F)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) (1 – 4 dias) dos grupos COVID-19 Leve, COVID-19 Progressão e COVID-19 Internados. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Cada grupo é representado com a sua mediana

e intervalo interquartil em gráficos de dispersão de pontos. As linhas pontilhadas indicam os valores de referência mínimos e máximos de cada parâmetro baseado no livro “*Practical Haematology – Dacie and Lewis*”, 2017. Pacientes que foram a óbito estão representados como pontos roxos nos gráficos. As diferenças estatísticas entre os grupos estão representadas por linhas para valores de $p < 0,05$.

4.4. Desempenho dos preditores hematológicos de acordo com as curvas ROC e TG-ROC

Para verificar a acurácia dos preditores em distinguir os resultados do COVID-19 e determinar o valor de corte (*cutoff value*) de cada parâmetro em diferentes situações, realizamos a análise da Curva ROC e da Curva TG-ROC. Embora o PLR também não tenha apresentado diferenças entre pacientes com COVID-19 Leve e Progressão de COVID-19, ele apresentou-se como um bom diferenciador entre os grupos Controles Negativos e Síndrome Gripal dos pacientes com COVID-19. Após análises de comparação de todos os grupos envolvendo os três parâmetros, apresentamos aqui apenas os gráficos nos quais os valores de p foram menores do que 0,05 e os valores da AUC foram superiores a 0,8, o que significa que há pelo menos 80% de probabilidade de que o modelo seja capaz de distinguir entre os dois grupos analisados.

A porcentagem de monócitos foi capaz de diferenciar com acurácia pacientes com COVID-19 Leve de pacientes hospitalizados e de pacientes que progrediram da doença leve para a internação, com *cutoff values* de 7% a 9%, respectivamente (**Fig. 12 A e B**). Para o grupo COVID-19 Leve vs. COVID-19 Internados, AUC obteve valores de 0,8059 (IC: 0,67 - 0,93), Se de 83,33% (IC: 76,62 - 94,49%), Sp de 60,53% (IC: 44,72 - 74,40%) e LR de 2,26; e para a comparação do grupo COVID-19 Leve vs. COVID-19 Progressão, a AUC foi de 0,8605 (IC: 0,70 - 1,00), Se de 80,00% (IC: 37,55 - 98,97%), Sp de 84,21% (IC: 69,58 - 92,56%) e LR de 5,07. Assim, quanto maior a MON%, mais provável é a presença de sintomas leves.

A razão de granulócitos por linfócitos (GLR) foi um parâmetro muito confiável e preciso ao comparar o grupo Controle Negativo com todos os pacientes com COVID-19 ou pacientes com COVID-19 que foram internados, e apresentou maior sensibilidade e especificidade com um *cutoff value* de 3 (**Fig. 13 A e B**). Ao comparar pacientes leves e com o grupo COVID-19 Progressão, o *cutoff value*

determinado foi de 10. (**Fig. 13 C**). Para o grupo Controle Negativo vs. COVID-19 Leve com valores de AUC de 0,8276 (IC: 0,73 - 0,91), Se de 98,04% (IC: 89,70 - 99,90%), Sp de 58,00% (IC: 44,23 - 70,62%) e LR de 2,33 e para o grupo COVID-19 Leve vs. COVID-19 Progressão AUC obteve o valor de 0,8711 (IC: 0,70 - 1,00), Se de 80,00% (IC: 37,55 - 98,97%), Sp de 89,47% (IC: 75,87 - 95,83%) e LR de 7,60. Ao comparar o Controle Negativo vs. COVID-19 Internados, dois perfis opostos, o GLR se apresentou como um preditor excepcional, com uma AUC de 0,9763, quase atingindo o valor de um preditor perfeito de 1. A sua Se foi de 98,04% (IC: 89,70 - 99,90%), Sp de 91,67% (IC: 64,61 - 99,57%) e LR de 11,71. Ou seja, pacientes com GLR acima de 3 tem 11,71 vezes mais chances de precisarem de internação hospitalar durante a COVID-19, do que serem indivíduos não infectados. Assim, um valor de GLR acima dos valores de corte pode indicar que pacientes infectados podem progredir para a forma grave da doença, com a possível necessidade de hospitalização.

Por fim, a razão de plaquetas por linfócitos foi capaz de distinguir muito bem os indivíduos Controle Negativo dos pacientes com COVID-19, sendo esse grupo incluindo todos os pacientes (*cutoff value*: 125), ou separado em COVID-19 Leve (*cutoff value*: 125), ou COVID-19 Internados (*cutoff value*: 165) (**Fig. 14 A, B e C**). Para o grupo Controle Negativo vs. COVID-19 com valores de área sob a curva (AUC) de 0,8327 (intervalo de confiança – IC: 0,75 - 0,90), Sensibilidade (Se) de 84,24% (IC: 76,62 - 94,49%), Especificidade (Sp) de 64,0% (IC: 50,14 - 75,86%) e razão de verossimilhança (LR) de 2,45; para o grupo Controle Negativo vs. COVID-19 Leve com valores de AUC de 0,8176 (IC: 0,72 - 0,90), Se de 88,24% (IC: 76,62 - 94,49%), Sp de 60,53% (IC: 44,72 - 74,40%) e LR de 2,23; e para Controle Negativo vs. COVID-19 Internados com valores de AUC de 0,8807 (IC: 0,76 - 0,99), Se de 94,04% (IC: 89,70 - 99,90%), Sp de 66,67% (IC: 39,06 - 86,19%) e LR de 2,94. Portanto, valores de PLR maiores que os valores de corte implicariam em uma possível infecção por COVID-19.

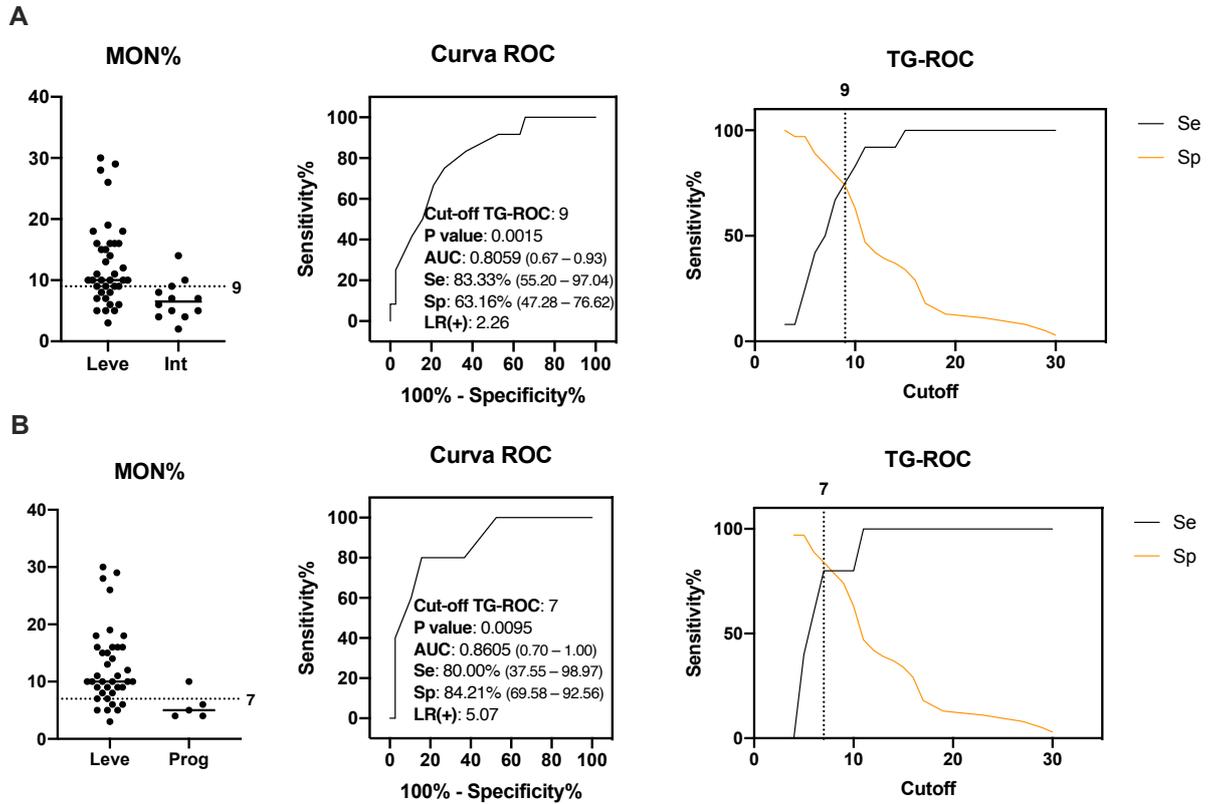


FIGURA 12. Desempenho de MON% em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC. A área sob a curva (AUC) indica a acurácia global de cada biomarcador usando limites específicos. Os gráficos de dispersão ilustram em detalhes o desempenho dos preditores com alta acurácia ($AUC > 0,8$). A curva ROC determina um valor de corte (*cutoff value*) baseado na maior sensibilidade (Se) e especificidade (Sp), que pode ser corroborada pela curva TG-ROC. Os índices de desempenho incluindo valor p, AUC, Sensibilidade (Se) e Especificidade (Sp) são fornecidos nas figuras. A linha pontilhada representa os pontos de corte selecionados pela análise da curva ROC e TG-ROC. **A)** MON% (COVID-19 Leve vs. COVID-19 Internados); **B)** MON% (COVID-19 Leve vs. COVID-19 Progressão).

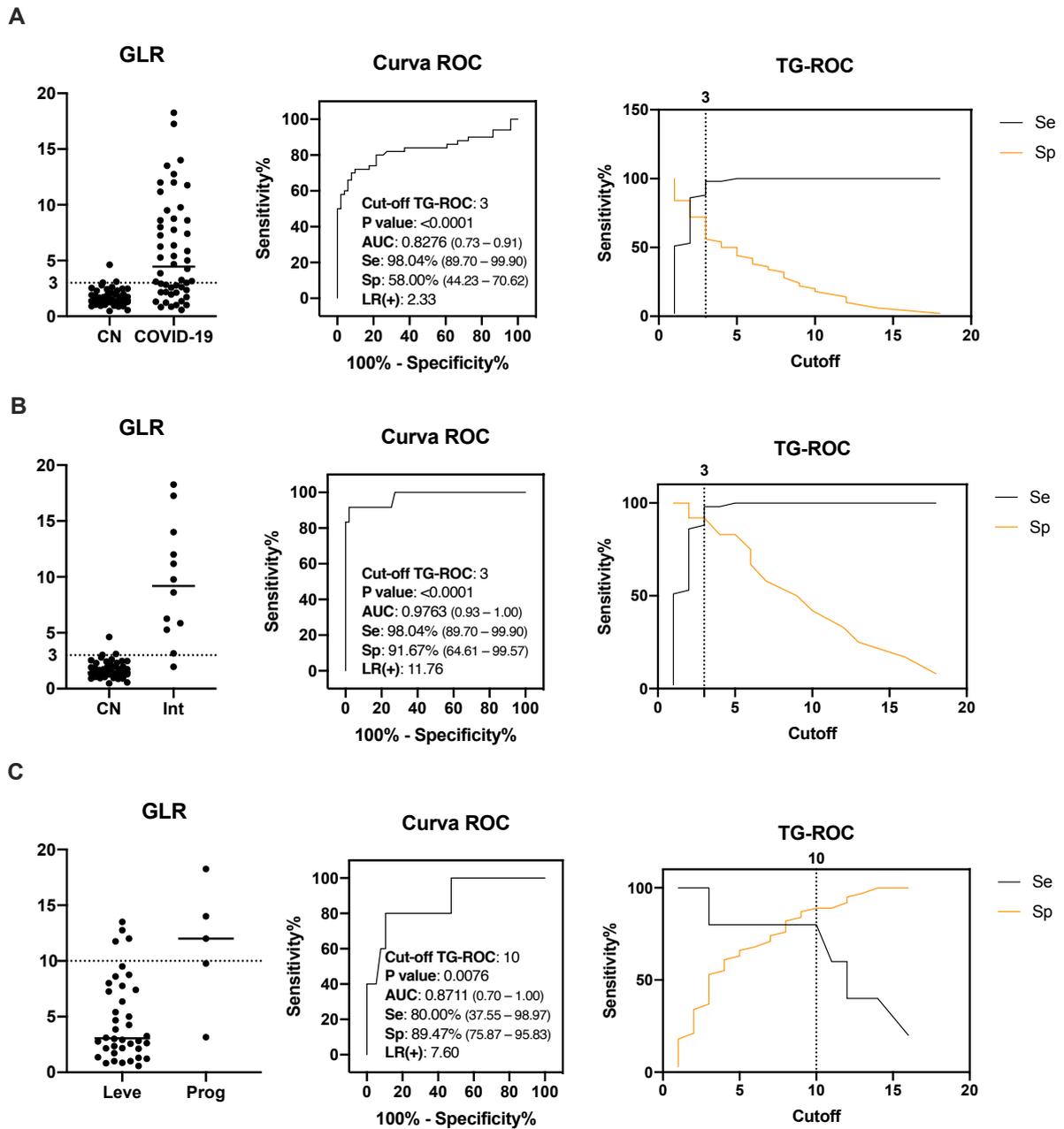


FIGURA 13. Desempenho de GLR em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC. A área sob a curva (AUC) indica a acurácia global de cada biomarcador usando limites específicos. Os gráficos de dispersão ilustram em detalhes o desempenho dos preditores com alta acurácia ($AUC > 0,8$). A curva ROC determina um valor de corte (*cutoff value*) baseado na maior sensibilidade (Se) e especificidade (Sp), que pode ser corroborada pela curva TG-ROC. Os índices de desempenho incluindo valor p, AUC, Sensibilidade (Se) e Especificidade (Sp) são fornecidos nas figuras. A linha pontilhada representa os pontos de corte selecionados pela análise da curva ROC e TG-ROC. **A)** GLR (todos os pacientes com COVID-19 vs. Controle Negativo); **B)** GLR (COVID-19 Internados vs. Controle Negativo); **C)** GLR (COVID-19 Leve vs. COVID-19 Progressão).

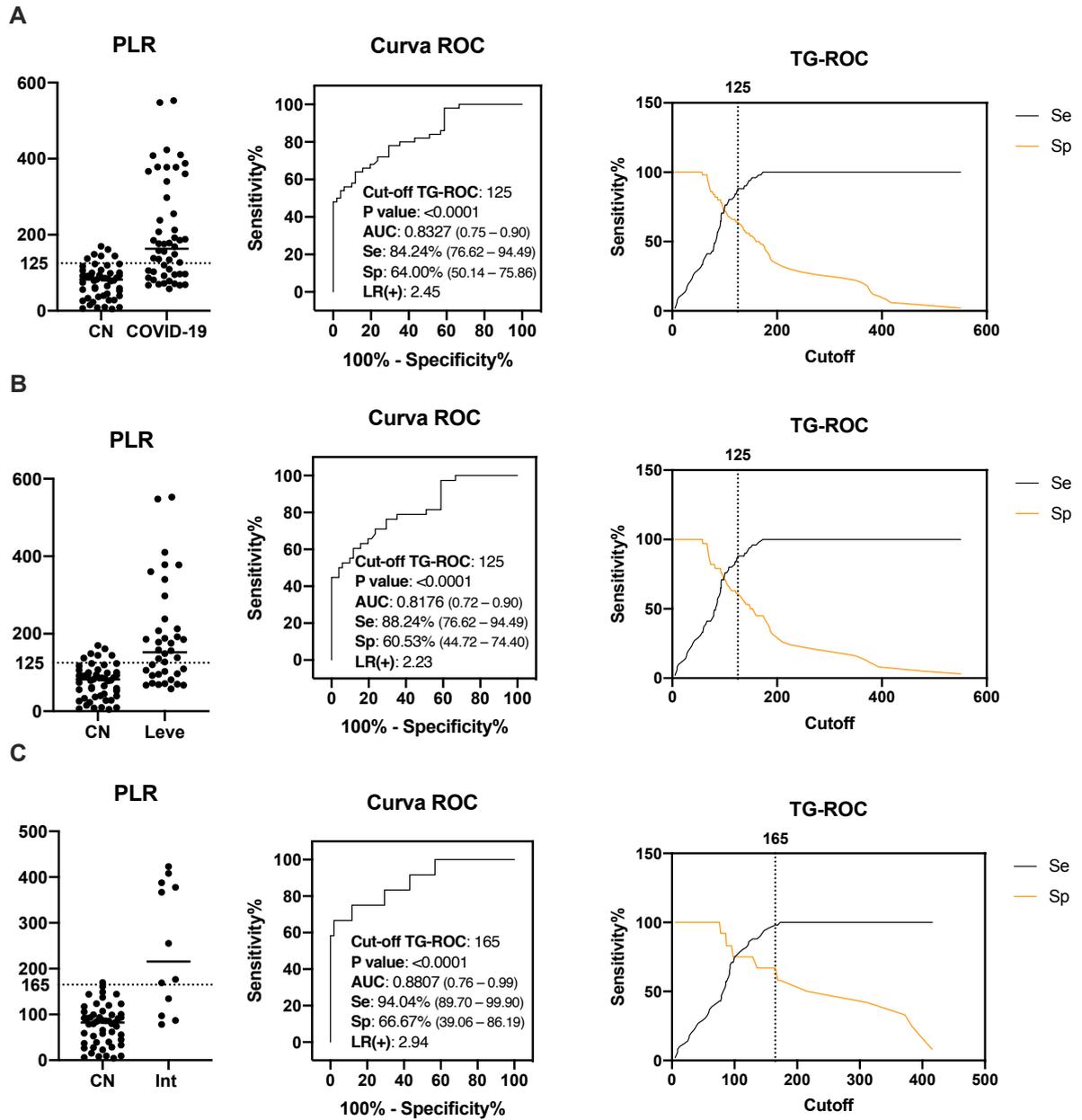


FIGURA 14. Desempenho de PLR em distinguir diferentes grupos calculados pela análise das Curvas ROC e TG-ROC. A área sob a curva (AUC) indica a acurácia global de cada biomarcador usando limites específicos. Os gráficos de dispersão ilustram em detalhes o desempenho dos preditores com alta acurácia ($AUC > 0,8$). A curva ROC determina um valor de corte (*cutoff value*) baseado na maior sensibilidade (Se) e especificidade (Sp), que pode ser corroborada pela curva TG-ROC. Os índices de desempenho incluindo valor p, AUC, Sensibilidade (Se) e Especificidade (Sp) são fornecidos nas figuras. A linha pontilhada representa os pontos de corte selecionados pela análise da curva ROC e TG-ROC. **A)** PLR (todos os pacientes com COVID-19 vs. Controle Negativo); **B)** PLR (COVID-19 Leve vs. Controle Negativo); **C)** PLR (COVID-19 Internados vs. Controle Negativo).

4.5. Proposta de algoritmo de árvore de decisão para classificar pacientes com COVID-19

Com base na acurácia global observada para esses parâmetros, também desenvolvemos algoritmos de árvore de decisão, que são um método de aprendizado de máquina supervisionado não paramétrico usado para classificar atributos, para investigar melhor esses preditores em um ambiente multivariado. A primeira árvore de decisão foi baseada nos atributos PLR, GLR e MON%, classificando Controles Negativos, Síndrome Gripal e indivíduos com COVID-19. Esta árvore revelou uma precisão de 86,02% [130/151], mas quando realizada uma validação cruzada por uma estratégia *leave-one-out* (LOOCV), a porcentagens de acertos caiu para 62,91% [95/151] na classificação dos indivíduos nos três grupos (**Fig. 15**). Na própria árvore, os parênteses com números representam o número de atributos que o algoritmo classificou corretamente e, em seguida, o número de atributos que o algoritmo classificou de forma errada. Por exemplo, lê-se (31.0/8.0): 31 é o número de indivíduos do grupo, 23 indivíduos foram classificados de forma correta, enquanto 8 indivíduos foram classificados de forma incorreta. Assim, nesse cenário, esses três parâmetros conseguiram atribuir os pacientes para a classificação clínica de forma correta 62% das vezes. Após a validação cruzada, essa árvore apresentou uma precisão moderada e muitas ramificações, se tornando de difícil interpretação e de utilização improvável na clínica médica.

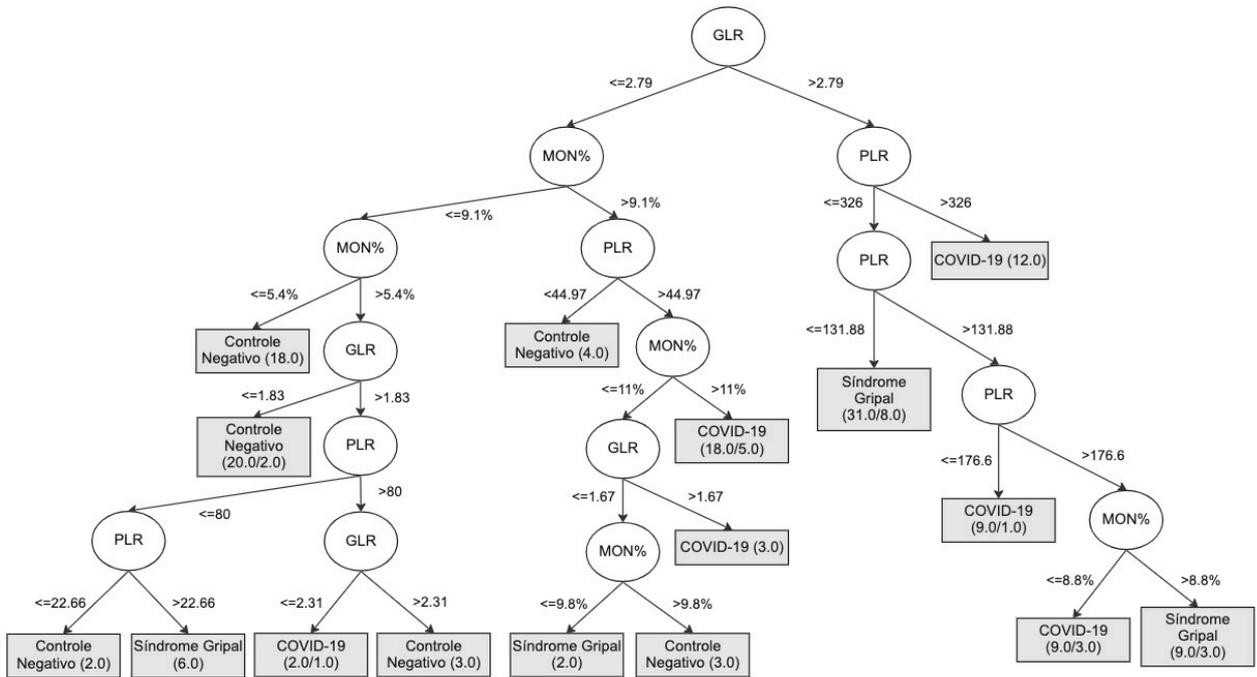


FIGURA 15. Árvore de decisão do diagnóstico da COVID-19. Árvore de decisão usando PLR, GLR e MON% para classificar os grupos de Controle Negativo, Síndrome Gripal e COVID-19. O conjunto de dados é composto por 3 atributos, 151 indivíduos, classificados em três classes: COVID-19 (33,11% [50/151]), Síndrome Gripal (33,11% [50/151]) e controle negativo (33,77% [51/151]). A precisão completa é de 86,09% [130/151] e, após a aplicação da estratégia de validação cruzada pela estratégia *leave-one-out* (LOOCV), o valor cai para 62,91% [95/151].

O segundo classificador de árvore de decisão proposto foi usar os atributos GLR e MON% para classificar os diferentes resultados do COVID-19: sintomas leves ou necessidade de hospitalização. Como o PLR não é um grande preditor do resultado do COVID-19, mas da infecção do COVID-19 como um todo, ele não foi incluído nesta análise específica. O algoritmo da árvore de decisão demonstrou que pacientes com monócitos acima de 7,7% têm probabilidade de ter um prognóstico mais ameno e pacientes com percentual de monócitos menor que 7,7% e valor de GLR maior que 8,75 têm maior probabilidade de desenvolver uma forma crítica da doença. A árvore de decisão revelou uma ótima precisão de 88,00% [44/50] e caiu para 86,00% [43/50] quando aplicada a LOOCV, além de ter apresentado valores semelhantes aos *cutoff values* encontrados nas análises TG-ROC (Fig. 16).

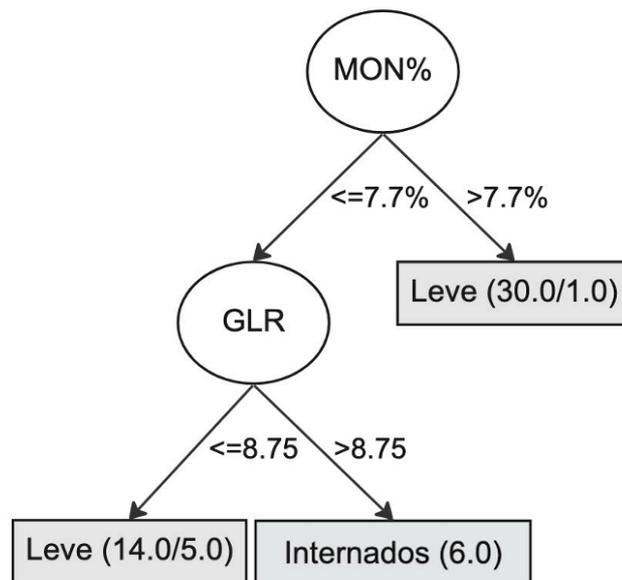


FIGURA 16. Árvore de decisão da gravidade da COVID-19. Árvore de decisão usando MON% e GLR para classificar o desfecho da doença de pacientes com COVID-19 leve ou internado. O conjunto de dados é composto por 2 atributos, 50 indivíduos, classificados em duas classes: Leve (76% [38/50]) e Internados (24% [12/50]). A precisão completa é de 88,00% [44/50] e, após a aplicação da estratégia de validação cruzada pela estratégia *leave-one-out* (LOOCV), o valor cai para 86% [43/50].

4.6. Os preditores hematológicos MON%, GLR e PLR não apresentam diferenças entre os diferentes grupos de risco

Por fim, avaliamos se existia alguma diferença nos valores de MON%, GLR e PLR entre os grupos de risco clássicos para a COVID-19, categorizados por gênero (masculino e feminino), faixa etária (adultos e idosos) e presença ou ausência de comorbidades. Nessa análise, foram utilizados todos os indivíduos com 5 – 15 dias de sintomas pois, ao restringir a 1 – 4 dias de sintomas, o número de indivíduos não foi suficiente para as análises. Nos parâmetros MON% e GLR, foram comparados um grupo COVID-19 total independente das formas clínicas e as diferentes formas clínicas da COVID-19 (leve e internados). Já no índice PLR, foram comparados os grupos COVID-19, Controle Negativo e Síndrome Gripal, visto que essa razão é a melhor em prever o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2.

Assim, verificamos que esses parâmetros preditores não apresentaram nenhuma diferença entre os sexos masculinos e femininos (**Fig. 17 A, B e C**) e não apresentaram diferenças entre adultos ou idosos (**Fig. 18 A, B e C**) e não

apresentaram diferença entre indivíduos com ou sem comorbidades (**Fig. 19 A, B e C**). Dessa forma, por esses parâmetros não apresentarem diferenças entre indivíduos de diferentes gêneros, idades e comorbidades, eles podem ser considerados preditores universais, o que facilita a sua utilização.

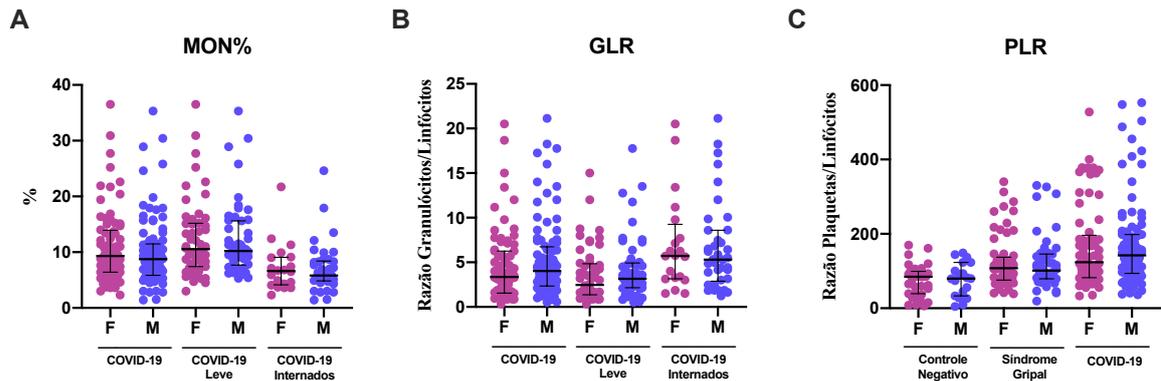


FIGURA 17. Comparação dos preditores hematológicos entre os gêneros feminino (F) e masculino (M). **A)** Porcentagem (%) de monócitos de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **B)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR) de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **C)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) de todos os Controle Negativos, Síndrome Gripal e pacientes com COVID-19. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os dados estão apresentados como gráficos de dispersão de pontos, destacando-se a mediana dos valores.

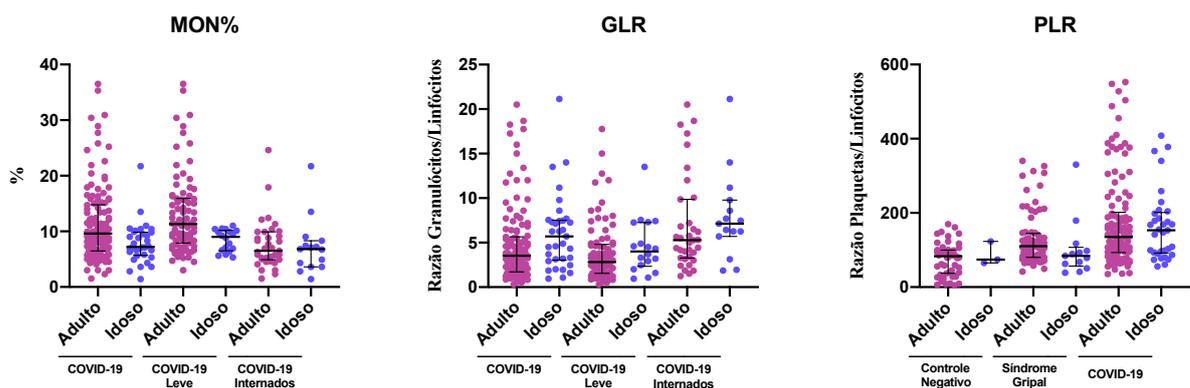


FIGURA 18. Comparação dos preditores hematológicos entre idades: adulto (18-59 anos) e idoso (>60). **A)** Porcentagem (%) de monócitos de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **B)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR) de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **C)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) de todos os Controle Negativos, Síndrome Gripal e pacientes com COVID-19. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os dados estão apresentados como gráficos de dispersão de pontos, destacando-se a mediana dos valores.

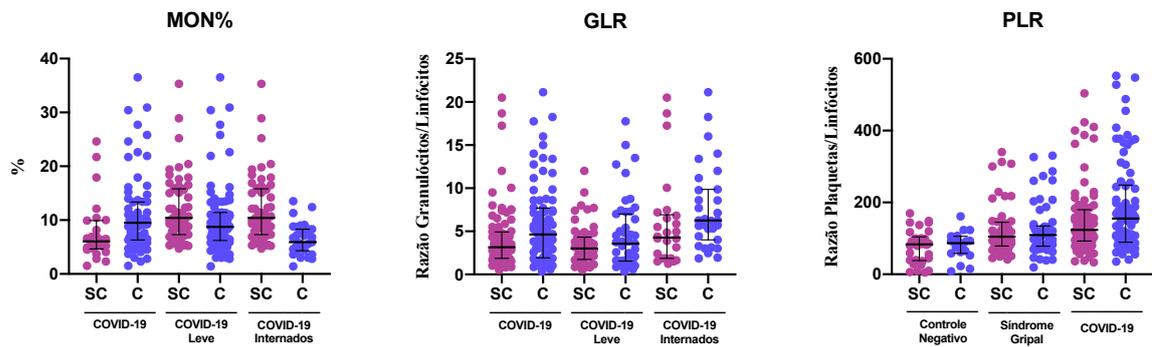


FIGURA 19. Comparação dos preditores hematológicos entre indivíduos com (C) ou sem comorbidades (SC). A) Porcentagem (%) de monócitos de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **B)** Razão de granulócitos por linfócitos (GLR) de todos os pacientes com COVID-19, COVID-19 Leve, COVID-19 Internados; **C)** Razão de plaquetas por linfócitos (PLR) de todos os Controle Negativo, Síndrome Gripal e pacientes com COVID-19. As análises estatísticas foram obtidas por meio do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os dados estão apresentados como gráficos de dispersão de pontos, destacando-se a mediana dos valores.

5. DISCUSSÃO

A COVID-19, doença causada pela infecção do trato respiratório humano pelo vírus SARS-CoV-2, pode apresentar-se com sintomas que variam desde aqueles característicos de um resfriado leve, até uma síndrome respiratória aguda grave (HEYMANN; SHINDO; HAZARDS†, 2020). Embora a gravidade e a mortalidade da COVID-19 estejam associadas aos grupos de risco bem conhecidos para a doença, como indivíduos com comorbidades, idosos e indivíduos do sexo masculino, ainda é necessário identificar novos biomarcadores e preditores de desfechos da doença para otimizar o tratamento dos pacientes e o gerenciamento hospitalar, principalmente, em locais mais precários (BISWAS et al., 2020). Assim, neste trabalho, procuramos encontrar parâmetros hematológicos que pudessem prever o resultado de pacientes com COVID-19 nos estágios iniciais da infecção.

É importante ressaltar que alguns dos parâmetros hematológicos de alguns indivíduos do grupo Controle Negativo encontraram-se fora das linhas de valores de referência. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que os únicos critérios de inclusão utilizados para indivíduos considerados “negativos” neste estudo foram teste negativo para SARS-CoV-2 RT-qPCR e não terem sido vacinados contra COVID-19. Assim, é possível que alguns desses indivíduos tenham outras doenças crônicas ou infecções assintomáticas não relatadas e não detectadas que também sejam acompanhadas de alterações nos parâmetros hematológicos. Além disso, é difícil utilizar marcadores que diferenciem pacientes com sintomas gripais de outros grupos, visto que esses pacientes relataram apenas sintomas gripais comuns e testaram negativo em RT-qPCR para SARS-CoV-2, o que significa que podem ser portadores de uma variedade de infecções diferentes.

Ao comparar os resultados do hemograma completo dos indivíduos participantes do estudo, observamos que os pacientes com COVID-19 apresentaram alterações clássicas relatadas na literatura dentro de 5 a 15 dias de sintomas. A linfopenia, uma das alterações hematológicas mais características decorrentes do COVID-19, já foi reportada como preditora da gravidade da doença (TAN et al., 2020b). No entanto, essa alteração parece ser perceptível apenas após, pelo menos, 5 dias de sintomas. Em relação aos granulócitos, já foi descrita uma tendência a altas contagens de neutrófilos na patologia da COVID-19, o que pode auxiliar no prognóstico da doença (HENRY et al., 2020). Lucas *et al.* relataram um aumento no número de eosinófilos,

mas, por outro lado, outros autores relataram uma diminuição dessas células em indivíduos com COVID-19 grave (DU et al., 2020; MAO et al., 2021; XIE et al., 2021). De acordo com uma revisão extensa feita por Murdaca *et al.*, existe uma tendência à basopenia em pacientes com COVID-19 e a contagem de basófilos pode ser uma ferramenta de prognóstico útil para COVID-19, uma vez que sua redução está associada a um pior prognóstico (MURDACA et al., 2021b). No entanto, os neutrófilos representam a maior parte dos granulócitos, o que corroboraria nossos dados de que a contagem de granulócitos é maior em pacientes graves com COVID-19. Foi relatado que o VCM está elevado em pacientes com COVID-19, contudo, dentro da faixa normal dos valores de referência (MAO et al., 2021). Em contrapartida, um estudo realizado com 1.327 pacientes no maior hospital de Wuhan, cidade de origem do SARS-CoV-2, relatou que pacientes sintomáticos com COVID-19 apresentavam menor VCM em comparação com pacientes assintomáticos (LU et al., 2021). Em nosso estudo, identificamos que os pacientes com COVID-19 Leve apresentaram VCM elevado, em comparação com os controles negativos, mas os pacientes com COVID-19 hospitalizados apresentaram um volume menor. Também já foi demonstrado que pacientes apresentando casos graves de COVID-19 que requerem hospitalização têm um índice PLR e LYM*PLT menor, quando comparados a pacientes com COVID-19 não hospitalizados (ASAN et al., 2021). As nossas análises estão de acordo com esses achados, já que observamos um declínio maior no LYM*PLT quanto maior a gravidade dos pacientes.

No entanto, essas alterações hematológicas clássicas nem sempre estão presentes no início da infecção por SARS-CoV-2. Portanto, selecionamos pacientes que tiveram seu sangue coletado nos primeiros quatro dias de sintomas para realizar as mesmas análises. Esse intervalo de tempo foi proposto com base na restrição mais precoce possível, com um número ainda razoável de indivíduos em nossa coorte. Também consideramos o qRT-PCR, que atualmente é o padrão-ouro e o teste de diagnóstico mais validado para COVID-19, e sua capacidade de detectar o RNA do vírus. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, os sintomas da COVID-19 podem aparecer de 2 a 14 dias após a exposição ao vírus e indivíduos assintomáticos devem esperar pelo menos 5 dias completos, após a exposição, antes de realizarem teste diagnóstico. No entanto, se os sintomas forem apresentados, o

teste deve ser imediato. Portanto, alguns dias após o início dos sintomas é quando provavelmente o indivíduo realizará o teste diagnóstico. Nosso objetivo foi identificar as alterações hematológicas precoces na fase aguda da doença. Com a restrição de tempo de até 4 dias de sintomas, observamos que a razão de plaquetas por linfócitos (PLR) é maior em pacientes com COVID-19 (tanto leve, quanto hospitalizados), podendo diferenciá-los do grupo controle e de pacientes do grupo Síndrome Gripal. Corroborando esse achado, Seyit *et al.* relataram que os níveis de PLR permaneceram significativamente mais altos em pacientes positivos para COVID-19, quando comparados a pacientes negativos para COVID-19 (SEYIT *et al.*, 2021). Já foi descrito que o PLR fica elevado em resposta a muitas condições pró-inflamatórias agudas ou crônicas (ERRE *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2020b; WANG *et al.*, 2018). Observamos também que pacientes hospitalizados com COVID-19 apresentaram menor percentual de monócitos, quando comparados a pacientes com COVID-19 leve. Apoiando nossos resultados, alguns autores sugerem que a contagem de monócitos é maior em pacientes com COVID-19, quando comparada a pacientes com Influenza, mas é menor em pacientes com COVID-19 internados na UTI (SUN *et al.*, 2020b; YUN *et al.*, 2020). Nesse caso, parece que os pacientes internados com COVID-19 sofrem uma modulação, visto que o perfil dessas células é mais semelhante aos indivíduos do grupo Controle Negativo. Assim, é possível que a elevação na contagem de monócitos possa auxiliar no combate à infecção e evitar que a doença tenha um desfecho grave. Sabe-se também que, após a infecção, os monócitos migram para os tecidos onde se tornam macrófagos residentes infectados, permitindo que os vírus se espalhem pelos órgãos e tecidos (JAFARZADEH *et al.*, 2020). Portanto, em pacientes com a forma grave da COVID-19, essa migração para o pulmão pode ser mais significativa, recrutados pelos sinais induzidos pela infecção, restando menos monócitos na circulação sanguínea periférica. Além disso, observamos que, na fase aguda inicial da doença, a linfopenia e o aumento de granulócitos ainda não são perceptíveis em pacientes com COVID-19, ou seja, a alteração hematológica mais relatada nessa doença ainda não é detectável nos primeiros dias de sintoma. No entanto, por meio de uma razão capaz de comparar os dois parâmetros em conjunto, como a razão de granulócitos por linfócitos (GLR), é possível diferenciar pacientes com COVID-19 leve de pacientes com COVID-19 internados nesse período. Assim, o GLR tem grande potencial para ser utilizado na triagem de pacientes na admissão nosocomial.

Vários estudos relataram que a razão de neutrófilos por linfócitos (NLR) é um parâmetro inflamatório associado a inúmeras doenças crônicas ou infecciosas. Nos últimos anos, o NLR tornou-se uma maneira fácil e prática de fornecer informações valiosas no diagnóstico de várias doenças. Já foi relatado que o NLR elevado está associado a um pior prognóstico em câncer colorretal, câncer gástrico, câncer de pulmão e malignidades ginecológicas, e é um biomarcador do microambiente tumoral, que pode ser usado como um fator prognóstico não apenas em tumores sólidos, mas também em neoplasias hematológicas (STEFANIUK; SZYMCZYK; PODHORECKA, 2020; ZHANG et al., 2017). No contexto da COVID-19, o NLR foi um dos primeiros marcadores descritos como um preditor eficaz da gravidade da doença nos estágios iniciais da infecção (ALY et al., 2021; LIU et al., 2020b). Ao comparar a AUC da curva ROC de vários parâmetros e índices hematológicos, o NLR já foi visto como o melhor índice para a identificação precoce de pacientes com alto risco de desenvolver a doença grave (ASAN et al., 2021; LIN et al., 2021). Alinhado a isso, alguns estudos relataram que uma razão de granulócitos por linfócitos (GLR) maior foi observada em pacientes com COVID-19 grave e que foi positivamente associada aos escores de gravidade da tomografia computadorizada, o que corrobora nossos resultados (KAZANCIOGLU et al., 2021; TAN et al., 2020a). O GLR elevado também já foi associado à progressão de tumores e menor sobrevida em humanos, e parece ser um parâmetro simples e clinicamente relevante para avaliar o estresse perioperatório em pacientes submetidos à cirurgia colorretal (LIU et al., 2020b; TABUCHI et al., 2011). Nesse contexto, é importante enfatizar as semelhanças entre o câncer e as doenças infecciosas: tanto os organismos infecciosos quanto as células cancerígenas expressam muitas proteínas que são reconhecíveis pelas células T do hospedeiro e ambas provocam inflamação mediada por células T (HOTCHKISS; MOLDAWER, 2014). Portanto, neoplasias e infecções virais podem resultar em alterações semelhantes nas células da corrente sanguínea humana, consequentemente, possuindo possivelmente biomarcadores similares para seus prognósticos. Em nosso estudo, propomos validar o GLR como um preditor de gravidade tão preciso e eficaz quanto o NLR, que é atualmente uma das razões mais utilizadas clinicamente e conhecidas. A maioria dos biomarcadores presentes na fase tardia da doença não são relevantes na fase aguda e vice-versa. Mas o GLR é uma exceção: seus valores elevados aparecem no início da infecção e persistem por até 15 dias de sintomas em pacientes internados, sugerindo que essa razão pode ser utilizada como preditor de

gravidade no curso da doença. Ao comparar a eficácia de NLR com GLR, foram observados valores quase idênticos entre os mesmos pacientes, uma vez que a subpopulação de granulócitos é composta, principalmente, por neutrófilos (**Anexo 4**). No entanto, o GLR pode ser ainda mais útil e acessível, principalmente em locais com infraestrutura mais precária e que não dispõem do equipamento de hemograma com análise diferencial dos subtipos de granulócitos.

Para confirmar se essas alterações hematológicas já estão presentes no início da sintomatologia, foram comparados 3 grupos: COVID-19 Leve, COVID-19 Progressão (pacientes que tiveram seu sangue coletado enquanto apresentavam sintomas leves, mas que evoluíram para internação) e COVID-19 Internados. Nessa análise, foram utilizados apenas os parâmetros e razões hematológicas que apresentaram maiores diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com COVID-19 (MON% e GLR) e maior diferença entre os grupos controle e pacientes com COVID-19 (PLR). Ao comparar as amostras coletadas nos períodos de 1 – 4 dias e 5 – 15 dias de sintomas, o PLR apenas apresentou diferença entre os grupos COVID-19 Leve e Internados no período de coleta de 5 – 15 dias de sintomas. Isso era esperado, visto que o PLR era um bom diferenciador entre controles negativos e indivíduos com síndrome gripal dos grupos COVID-19, e não entre as formas clínicas da doença. Por outro lado, ambos os parâmetros MON% e GLR apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo COVID-19 Leve e o grupo COVID-19 Progressão nos primeiros 4 dias de sintomas, significando que os pacientes que evoluem para a forma grave da doença já apresentam alterações hematológicas, semelhantes a de pacientes internados, nos primeiros dias de sintomas. Assim, é possível observar que, quando a porcentagem de monócitos está acima da linha do valor de referência nos primeiros dias de sintoma, os indivíduos diagnosticados com COVID-19 por RT-qPCR para SARS-CoV2 têm maior probabilidade de apresentarem uma forma leve da doença. Por outro lado, um GLR mais alto nos primeiros dias de sintoma pode indicar um pior prognóstico da COVID-19. Dessa forma, isso sugere que MON% e GLR podem ser utilizados como preditores de desfecho da COVID-19.

Com o objetivo de avaliar a acurácia desses biomarcadores e seus poderes de predição, realizamos análises de curvas ROC. Atualmente, não existem valores de referência para esses parâmetros na infecção por SARS-CoV-2 na literatura, especialmente para GLR, que raramente é citado em estudos de COVID-19. Quando

o valor do GLR se encontra entre 5 – 20, por exemplo, isso pode significar uma maior probabilidade de um paciente enfermo evoluir para a forma grave da doença. Embora essa referência seja ampla, fica claro que é essencial que seja determinado valores médios de referências de razões hematológicas para serem utilizados como base em hospitais e centros de saúde. Por isso, curvas TG-ROC foram realizadas para determinar valores de corte (*cutoff values*) com base na interseção da maior especificidade e sensibilidade.

O PLR foi ótimo em diferenciar indivíduos do grupo Controle Negativo de pacientes com COVID-19, com AUCs acima de 0.8, que é considerado um valor com alto poder preditivo. Os valores de corte (*cutoff values*) variaram entre 125 e 165, sendo que o maior valor seria para diferenciar especificamente pacientes internados. Já a porcentagem de monócitos distinguiu claramente os pacientes com COVID-19 com sintomas leves de pacientes internados (*cutoff value*: 9%) e até mesmo de pacientes com sintomas leves que depois progrediram para a doença grave e precisaram de internação hospitalar (*cutoff value*: 7%), também apresentando AUC acima de 0.8. Por fim, ao comparar pacientes com COVID-19 Leve e COVID-19 Progressão, um valor de GLR maior do que 10 pode indicar que sintomas leves podem progredir para a necessidade de hospitalização (AUC: 0.81). Com o valor de corte (*cutoff value*) de 3, o GLR consegue distinguir muito bem os Controle Negativos de pacientes com COVID-19 (AUC: 0.92) e ainda com mais acurácia, de pacientes com COVID-19 Internados (AUC: 0.97).

Para avaliar os valores de corte das curvas TG-ROC em um cenário multivariado, ou seja, levando em conta mais de um parâmetro por vez, propusemos algoritmos de árvore de decisão para dois cenários: a primeira árvore de decisão, baseada no PLR, GLR e MON%, foi capaz de classificar indivíduos Controle Negativo, com Síndrome Gripal e com COVID-19 com uma precisão de 62,91%. Por outro lado, a segunda árvore utilizou apenas a MON% e o GLR para classificar as formas clínicas de COVID-19 Leve ou Internado. Nesse caso, a árvore atribuiu um menor percentual de monócitos ($\leq 7.7\%$) e maior GLR (> 8.75) aos pacientes internados, com uma precisão de acertos de 86%. Os valores de corte do TG-ROC e da árvore de decisão não são iguais, pois são analisados em contextos diferentes, mas corroboram-se. A primeira é feita de forma univariada e a segunda de forma multivariada, comparando múltiplos parâmetros em um determinado cenário. Esse tipo de abordagem de aprendizado de

máquina pode ser extremamente útil em triagens de pacientes e pode ser facilmente interpretada pela equipe hospitalar. De acordo com o livro *Practical Haematology* de Dacie e Lewis, 2017, vários parâmetros hematológicos possuem valores de referência diferentes para mulheres e homens. Entretanto, ao analisar esses três parâmetros (MON%, GLR e PLR), verificamos que eles não apresentaram diferenças significativas entre os sexos masculino e feminino. Além disso, esses preditores também não apresentam diferenças entre indivíduos adultos e idosos, assim como não são diferentes em indivíduos com ou sem comorbidades, tornando-os, assim, preditores universais. Dessa forma, qualquer pessoa que apresentar alterações nesses parâmetros nos primeiros dias de sintoma podem ser observadas com mais cautela por profissionais médicos, já que apresentam maior probabilidade de desenvolverem a forma grave da doença, independente de sexo, idade e presença de comorbidades.

Esses preditores hematológicos têm grande potencial para aplicação clínica e podem ter implicações sociais positivas visto que, além de serem biomarcadores de fácil quantificação, são muito baratos. Isso pode ser de grande importância, principalmente em locais precários que possuem apenas equipamentos hematológicos mais antigos, que não são capazes de realizar a diferenciação dos subtipos de granulócitos. Além disso, em situações de escassez de materiais hospitalares e de testes diagnósticos para COVID-19, os preditores hematológicos podem auxiliar em uma triagem durante momentos críticos. Outro ponto positivo desses preditores precoces é a identificação de pacientes que têm potencial de desenvolverem a forma grave da doença com apenas poucos dias de infecção, aumentando a probabilidade de sucesso de uma intervenção terapêutica. Os tratamentos com antivirais, que recentemente foram aprovados por diversas agências de vigilância sanitária, devem ser iniciados nos primeiros 5 dias de sintomas para serem efetivos (SARAVOLATZ; DEPCINSKI; SHARMA, 2023). Por isso, esses preditores podem ser úteis por tratar-se de biomarcadores presentes até o 4º dia desde o início de sintomas, identificando os pacientes que mais se beneficiarão da administração de medicamentos antivirais.

No entanto, os dados obtidos devem ser avaliados com cautela, visto que as amostras de sangue dos indivíduos incluídos neste estudo foram coletadas entre dezembro de 2020 e junho de 2021, quando a cepa original e a variante P.1 do SARS-CoV-2 eram dominantes no Brasil. A partir de 2022, a cepa Ômicron se tornou mais

abundante e pode causar diferentes alterações hematológicas e resultar em diferentes prognósticos para os pacientes. Assim, são necessários mais estudos sobre biomarcadores e preditores de resultados de COVID-19 em cenários de novas cepas variantes e mutações virais. Além disso, apesar do cenário atual da vacinação, com mais de 13 bilhões de doses já administradas mundialmente, resultando em uma diminuição drástica no número de casos e de mortes, ainda existem muitas mortes, mesmo em indivíduos vacinados, que poderiam ser evitadas.

É importante destacar o pioneirismo de nosso estudo visto que, apesar de outros estudos já terem avaliado o poder preditivo de alguns parâmetros hematológicos, eles geralmente não apresentam restrição de dias de sintomas, ou seja, não podem ser considerados preditores precoces. Outro diferencial do nosso trabalho é a presença de um grupo de pacientes que tiveram o seu sangue coletado antes da progressão para a doença grave e necessidade de internação hospitalar utilizado para avaliar o poder preditivo dos parâmetros hematológicos. Além disso, apesar de utilizarem ferramentas como a Curva ROC, os estudos anteriores não utilizaram a Curva TG-ROC para estabelecer pontos de corte e poucos utilizam o algoritmo de Árvore de Decisão para a validação dos mesmos (ASAN et al., 2021; LIN et al., 2021). De toda forma, mesmo os estudos que utilizaram dessa ferramenta de aprendizado de máquina, eles não avaliaram índices e razões hematológicas, apenas resultados advindos diretamente do hemograma (ALVES et al., 2021; ELSHAZLI et al., 2020b; GIOTTA et al., 2022; SZKLANNA et al., 2021). Além disso, nosso trabalho também foi um dos pioneiros na identificação da eficácia do GLR como preditor precoce na COVID-19.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo identificou que os pacientes com COVID-19 apresentaram um PLR elevado, em comparação aos indivíduos com síndrome gripal ou saudáveis, e que os pacientes com COVID-19 que necessitam de internação hospitalar, em sua maioria, apresentaram uma baixa porcentagem de monócitos, embora dentro dos valores de referência, e um GLR elevado, quando comparados com pacientes que apresentaram sintomas leves da COVID-19. Ademais, tanto as alterações no GLR, quanto na MON%, já estão presentes e podem ser identificadas em pacientes com sintomas leves na fase aguda da doença que evoluíram para a internação hospitalar. Nesse cenário, o GLR se mostra um preditor ainda mais vantajoso do que o NLR, que já é utilizado como preditor de desfecho, pois pode ser utilizado na triagem em locais que não possuem um analisador hematológico capaz de realizar a contagem diferencial de granulócitos. Assim, em um ambiente clínico, os valores de corte estabelecidos podem ajudar enfermeiros e médicos a discriminar pacientes na admissão hospitalar no início da infecção e, se necessário, administrar medicamentos antivirais para pacientes com maior risco de desenvolver a forma grave da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, R. B. et al. Thromboelastometry demonstrates endogenous coagulation activation in nonsevere and severe COVID-19 patients and has applicability as a decision algorithm for intervention. **PLOS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0262600, 1 jan. 2022.
- ALVES, M. A. et al. Explaining machine learning based diagnosis of COVID-19 from routine blood tests with decision trees and criteria graphs. **Computers in Biology and Medicine**, v. 132, p. 104335, 1 maio 2021.
- ALY, M. M. et al. Can Hematological Ratios Predict Outcome of COVID-19 Patients? A Multicentric Study. **Journal of Blood Medicine**, v. 12, p. 505, 2021.
- ASAN, A. et al. Do initial hematologic indices predict the severity of COVID-19 patients? **Turkish journal of medical sciences**, v. 51, n. 1, p. 39–44, 2021.
- AYRES, L. S.; SGNAOLIN, V.; MUNHOZ, T. P. Immature granulocytes index as early marker of sepsis. **International journal of laboratory hematology**, v. 41, n. 3, p. 392–396, 1 jun. 2019.
- BEHRENS, E. M.; KORETZKY, G. A. Review: Cytokine Storm Syndrome: Looking Toward the Precision Medicine Era. **Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 69, n. 6, p. 1135–1143, 1 jun. 2017.

BELLMANN-WEILER, R. et al. Prevalence and Predictive Value of Anemia and Dysregulated Iron Homeostasis in Patients with COVID-19 Infection. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 1 ago. 2020.

BHARGAVA, N. et al. Decision Tree Analysis on J48 Algorithm for Data Mining. **International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering**, v. 3, n. 6, p. 2277, 2013.

BISWAS, M. et al. Association of Sex, Age, and Comorbidities with Mortality in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Intervirolgy**, v. 64, n. 1, p. 36–47, 1 jan. 2020.

BÖSMÜLLER, H. et al. The pulmonary pathology of COVID-19. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 478, n. 1, p. 137–150, 1 jan. 2021.

BRIGGS, C.; BAIN, B. J. Basic Haematological Techniques. **Dacie and Lewis Practical Haematology: Twelfth Edition**, p. 18–49, 2017.

CELKAN, T. T. What does a hemogram say to us? **Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi**, v. 55, n. 2, p. 103, 2020.

CHEN, X.-H.; HUANG, S.; KERR, D. Biomarkers in clinical medicine. **IARC scientific publications**, n. 163, p. 303–22, 2011.

CHENG, V. C. C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 660–694, out. 2007.

CHILAMAKURI, R.; AGARWAL, S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 206, 21 jan. 2021.

Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

COZZI, D. et al. Ground-glass opacity (GGO): a review of the differential diagnosis in the era of COVID-19. **Japanese journal of radiology**, v. 39, n. 8, p. 721–732, 1 ago. 2021.

DJAKPO, D. K. et al. Blood routine test in mild and common 2019 coronavirus (COVID-19) patients. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 8, 1 ago. 2020.

DU, Y. et al. Clinical features of 85 fatal cases of COVID-19 from Wuhan: A retrospective observational study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1372–1379, 1 jun. 2020.

EJAZ, H. et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1833, 1 dez. 2020.

EL-HAJJAR, L.; ALI AHMAD, F.; NASR, R. A Guide to Flow Cytometry: Components, Basic Principles, Experimental Design, and Cancer Research Applications. **Current protocols**, v. 3, n. 3, p. e721, 1 mar. 2023.

ELSHAZLI, R. M. et al. Diagnostic and prognostic value of hematological and immunological markers in COVID-19 infection: A meta-analysis of 6320 patients. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, 1 ago. 2020a.

ELSHAZLI, R. M. et al. Diagnostic and prognostic value of hematological and immunological markers in COVID-19 infection: A meta-analysis of 6320 patients. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8, 1 ago. 2020b.

ERRE, G. L. et al. Meta-analysis of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio in rheumatoid arthritis. **European journal of clinical investigation**, v. 49, n. 1, 1 jan. 2019.

FAWCETT, T. An introduction to ROC analysis. **Pattern Recognition Letters**, v. 27, n. 8, p. 861–874, 1 jun. 2006.

FEI, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, C. The application of lymphocyte*platelet and mean platelet volume/platelet ratio in influenza A infection in children. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 33, n. 9, 1 nov. 2019.

GAO, K. et al. The predictive role of monocyte-to-lymphocyte ratio in osteoporosis patient. **Medicine**, v. 98, n. 34, 2019.

GASPARYAN, A. Y. et al. The Platelet-to-Lymphocyte Ratio as an Inflammatory Marker in Rheumatic Diseases. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 39, n. 4, p. 345, 2019.

GIBSON, P. G.; QIN, L.; PUAH, S. H. COVID-19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre-COVID-19 ARDS. **The Medical journal of Australia**, v. 213, n. 2, p. 54- 56.e1, 1 jul. 2020.

GIOTTA, M. et al. Application of a Decision Tree Model to Predict the Outcome of Non-Intensive Inpatients Hospitalized for COVID-19. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 20, 1 out. 2022.

GOTTLIEB, R. L. et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 4, p. 305–315, 27 jan. 2022.

GRAHAM, M. D. The Coulter Principle: A history. 2021.

HARAPAN, H. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 5, p. 667, 1 maio 2020.

HENRY, B. M. et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 25 jun. 2020.

HEYMANN, D. L.; SHINDO, N.; HAZARDS†, W. S. AND T. A. G. FOR I. COVID-19: what is next for public health? **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10224, p. 542, 22 fev. 2020.

- HIGGINS, J. M. et al. Association of Red Blood Cell Distribution Width With Mortality Risk in Hospitalized Adults With SARS-CoV-2 Infection. **JAMA network open**, v. 3, n. 9, 23 set. 2020.
- HOO, Z. H.; CANDLISH, J.; TEARE, D. What is an ROC curve? **Emergency medicine journal : EMJ**, v. 34, n. 6, p. 357–359, 1 jun. 2017.
- HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L. Parallels between Cancer and Infectious Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 4, p. 380–383, 24 jul. 2014.
- HSU, M. J.; CHANG, Y. C. I.; HSUEH, H. M. Biomarker selection for medical diagnosis using the partial area under the ROC curve. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 10 jan. 2014.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497, 15 fev. 2020.
- HUANG, Y. et al. Immature granulocytes: A novel biomarker of acute respiratory distress syndrome in patients with acute pancreatitis. **Journal of critical care**, v. 50, p. 303–308, 1 abr. 2019.
- HUYUT, M. T.; ÜSTÜNDAĞ, H. Prediction of diagnosis and prognosis of COVID-19 disease by blood gas parameters using decision trees machine learning model: a retrospective observational study. **Medical gas research**, v. 12, n. 2, p. 60–66, 2022.
- ILIADI, V. et al. The Emerging Role of Neutrophils in the Pathogenesis of Thrombosis in COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, p. 5368, 20 maio 2021.
- JAFARZADEH, A. et al. Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: Lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. **Life Sciences**, v. 257, p. 118102, set. 2020.
- JIA, H. P. et al. ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14614, 15 dez. 2005.
- KARIMI SHAHRI, M.; NIAZKAR, H. R.; RAD, F. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 43, n. 2, p. 160–168, 1 abr. 2021.
- KAUSAR, S. et al. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 35, 2021.
- KAZANCIOGLU, S. et al. Lymphocyte Subset Alteration and Monocyte CD4 Expression Reduction in Patients with Severe COVID-19. **Viral Immunology**, v. 34, n. 5, p. 342–351, 1 jun. 2021.
- LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology** 2022 20:5, v. 20, n. 5, p. 270–284, 30 mar. 2022.

- LI, B. et al. Platelet-to-lymphocyte ratio in advanced Cancer: Review and meta-analysis. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 483, p. 48–56, 1 ago. 2018.
- LIN, S. et al. Associations between hematological parameters and disease severity in patients with SARS-CoV-2 infection. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 1, 1 jan. 2021.
- LIPPI, G.; HENRY, B. M.; FAVALORO, E. J. Mean Platelet Volume Predicts Severe COVID-19 Illness. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 47, n. 4, p. 456–459, 1 jun. 2021.
- LIU, H. et al. The granulocyte/lymphocyte ratio as an independent predictor of tumour growth, metastasis and progression: Its clinical applications. **Molecular medicine reports**, v. 1, n. 5, p. 699–704, 2008.
- LIU, J. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 20 maio 2020a.
- LIU, L. et al. Is the platelet to lymphocyte ratio a promising biomarker to distinguish acute appendicitis? Evidence from a systematic review with meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 15, n. 5, 1 maio 2020b.
- LORENTE, L. et al. Association between red blood cell distribution width and mortality of COVID-19 patients. **Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine**, v. 40, n. 1, p. 100777, 1 fev. 2021.
- LU, C. et al. Clinical characteristics of 1327 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the largest Fangcang shelter hospital in Wuhan. **Chinese Medical Journal**, v. 134, n. 2, p. 241–242, 20 jan. 2021.
- LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature 2020 584:7821**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 27 jul. 2020.
- MALINIS, M. et al. An overview on the use of antivirals for the treatment of patients with COVID19 disease. 2020.
- MANDREKAR, J. N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, 1 set. 2010.
- MAO, J. et al. Hematologic changes predict clinical outcome in recovered patients with COVID-19. **Annals of Hematology**, v. 100, n. 3, p. 675–689, 1 mar. 2021.
- MARIA DA SILVA, R.; LOPES, Y.; IV, N. Márcia Dalastra Laurenti II Almério de Castro Gomes III. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 6, p. 1044–53, 2009.
- MARIAPPAN, V. et al. Potential biomarkers for the early prediction of SARS-COV-2 disease outcome. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105057, 1 set. 2021.
- MARZI, M. et al. Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and In Silico Study. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–16, 7 jul. 2022.

MEHTA, P. et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10229, p. 1033, 28 mar. 2020.

MENACHERY, V. D.; GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Jumping species—a mechanism for coronavirus persistence and survival. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 1, 1 abr. 2017.

MINA, A.; BESIEN, K. VAN; PLATANIAS, L. C. Hematological manifestations of COVID-19. <https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1788017>, p. 2790–2798, 2020.

MOHAMMED, I. et al. The efficacy and effectiveness of the COVID-19 vaccines in reducing infection, severity, hospitalization, and mortality: a systematic review. v. 18, n. 1, 2027.

MURDACA, G. et al. Basophils and Mast Cells in COVID-19 Pathogenesis. **Cells**, v. 10, n. 10, 1 out. 2021a.

MURDACA, G. et al. Basophils and Mast Cells in COVID-19 Pathogenesis. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2754, 14 out. 2021b.

MYARI, A.; PAPAPETROU, E.; TSAOUSI, C. Diagnostic value of white blood cell parameters for COVID-19: Is there a role for HFLC and IG? **International Journal of Laboratory Hematology**, 2021.

NAHM, F. S. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 75, n. 1, p. 25, 1 fev. 2022.

NARANBHAI, V. et al. The association between the ratio of monocytes:lymphocytes at age 3 months and risk of tuberculosis (TB) in the first two years of life. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 120, 29 jul. 2014.

NI, W. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 13 jul. 2020.

PARIKH, R. et al. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 56, n. 1, p. 45, 2008.

POLO, T. C. F.; MIOT, H. A. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, p. 1–4, 11 dez. 2020.

Practical Flow Cytometry - Howard M. Shapiro - Google Books. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=JhSyimPKuJwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Shapiro+HM.+Practical+Flow+Cytometry.+Wiley-Liss,+NY,+USA,+1%E2%80%93\(2003\).&ots=OSCSzVTQPA&sig=_WgQA9PaCAp5DpfTsUJ-G68CxY4&redir_esc=y#v=snippet&q=scatter&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=en&lr=&id=JhSyimPKuJwC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Shapiro+HM.+Practical+Flow+Cytometry.+Wiley-Liss,+NY,+USA,+1%E2%80%93(2003).&ots=OSCSzVTQPA&sig=_WgQA9PaCAp5DpfTsUJ-G68CxY4&redir_esc=y#v=snippet&q=scatter&f=false)>. Acesso em: 21 dez. 2021.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 1 ago. 2020.

REICHENHEIM, M. E. Two-graph receiver operating characteristic. **The Stata Journal**, v. 2, n. 4, p. 351–357, 2002.

ROBINSON, J. P. Wallace H. Coulter: Decades of invention and discovery. **Cytometry Part A**, v. 83A, n. 5, p. 424–438, 1 maio 2013.

SARAVOLATZ, L. D.; DEPCINSKI, S.; SHARMA, M. Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir: Oral Coronavirus Disease 2019 Antiviral Drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 1, p. 165–171, 6 jan. 2023.

SEYIT, M. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio to predict the severity of COVID-19. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 40, p. 110, 1 fev. 2021.

SHARMA, O. et al. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2413, 14 out. 2020.

SRIVASTAVA, S.; GOPAL-SRIVASTAVA, R. Biomarkers in Cancer Screening: A Public Health Perspective. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 8, p. 2471S-2475S, 1 ago. 2002.

STEFANIUK, P.; SZYMCZYK, A.; PODHORECKA, M. The Neutrophil to Lymphocyte and Lymphocyte to Monocyte Ratios as New Prognostic Factors in Hematological Malignancies – A Narrative Review. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 2961, 2020.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, nov. 2010.

SUN, Q. et al. Lower mortality of COVID-19 by early recognition and intervention: experience from Jiangsu Province. **Annals of Intensive Care**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 1 dez. 2020a.

SUN, S. et al. Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 507, p. 174, 1 ago. 2020b.

SZKLANNA, P. B. et al. Routine Hematological Parameters May Be Predictors of COVID-19 Severity. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 682843, 16 jul. 2021.

TABUCHI, T. et al. The perioperative granulocyte/lymphocyte ratio is a clinically relevant marker of surgical stress in patients with colorectal cancer. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 243–248, 1 fev. 2011.

TAHA JIJO, B.; MOHSIN ABDULAZEEZ, A. Classification Based on Decision Tree Algorithm for Machine Learning. **Journal of Applied Science and Technology Trends**, v. 2, n. 01, p. 20–28, 24 mar. 2021.

TAKAHASHI, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature 2020 588:7837**, v. 588, n. 7837, p. 315–320, 26 ago. 2020.

TAN, C. et al. C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 7, p. 856–862, 1 jul. 2020a.

TAN, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 1 dez. 2020b.

TANERI, P. E. et al. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 8, p. 763, 1 ago. 2020.

TISONCIK, J. R. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16–32, mar. 2012.

TORAIH, E. A. et al. Association of cardiac biomarkers and comorbidities with increased mortality, severity, and cardiac injury in COVID-19 patients: A meta-regression and decision tree analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 11, p. 2473–2488, 6 nov. 2020.

TRAN, V.-T. et al. Efficacy of first dose of covid-19 vaccine versus no vaccination on symptoms of patients with long covid: target trial emulation based on ComPaRe e-cohort. **BMJ Medicine**, v. 2, n. 1, p. e000229, 1 fev. 2023.

TURKMEN, K. et al. The neutrophil lymphocyte ratio may be useful inflammatory indicator before applying other expensive and invasive procedures. **Indian Journal of Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 65, jan. 2014.

UMAKANTHAN, S. et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgraduate medical journal**, v. 96, n. 1142, p. 753–758, 1 dez. 2020.

WANG, Q. et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in acute pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. **International angiology : a journal of the International Union of Angiology**, v. 37, n. 1, p. 4–11, 1 fev. 2018.

WENZHONG, LIU; HUALAN, L. COVID-19 Disease: ORF8 and Surface Glycoprotein Inhibit Heme Metabolism by Binding to Porphyrin. 13 jul. 2020.

WHITEHEAD, R. D. et al. Methods and analyzers for hemoglobin measurement in clinical laboratories and field settings. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1450, n. 1, p. 147–171, 2019.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

WONG, R. S. Y. Inflammation in COVID-19: from pathogenesis to treatment. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 14, n. 7, p. 831, 2021.

- WONG, T. T. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation. **Pattern Recognition**, v. 48, n. 9, p. 2839–2846, 1 set. 2015.
- XIE, G. et al. The role of peripheral blood eosinophil counts in COVID-19 patients. **Allergy**, v. 76, n. 2, p. 471–482, 1 fev. 2021.
- XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science 2020 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 24 fev. 2020.
- YANG, X. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 8, n. 5, p. 475, 1 maio 2020a.
- YANG, X. et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 18, n. 6, p. 1469–1472, 1 jun. 2020b.
- YUAN, X. et al. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. **International Journal of Hematology**, v. 112, n. 4, p. 1, 1 out. 2020.
- YUKI, K.; FUJIOGI, M.; KOUTSOGIANNAKI, S. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 215, p. 108427, 1 jun. 2020.
- YUN, H. et al. Laboratory data analysis of novel coronavirus (COVID-19) screening in 2510 patients. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 507, p. 94, 1 ago. 2020.
- ZHANG, J. et al. The elevated NLR, PLR and PLT may predict the prognosis of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 68837, 19 jun. 2017.
- ZHANG, S. et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, 4 set. 2020.
- ZHU, R. et al. Routine blood parameters are helpful for early identification of influenza infection in children. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2020.

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 - Identificação da pesquisa:

Título do Projeto: Impacto do perfil de imunossenescência no desfecho da COVID-19.

2 - Informações ao participante ou responsável:

1. Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada “*Impacto da imunossenescência no desfecho da COVID-19*”. O tempo de duração desta pesquisa será de 22 meses, sendo que a coleta de dados terá início em Fevereiro de 2021 e término em Novembro de 2022. A sua participação no estudo ocorrerá no período do atendimento até o desaparecimento dos sintomas da doença caso a infecção pelo SARS-CoV2 seja confirmada. Se o resultado do teste para o SARS-CoV2 for negativo, sua participação se encerrará depois da coleta do material biológico (sangue e fezes). Caso concorde em participar desta pesquisa, ao final da leitura deste termo de consentimento você deverá assiná-lo em duas vias, sendo que uma delas ficará com os pesquisadores responsáveis e a outra via com o participante da pesquisa.

2. Essa pesquisa tem como objetivo entender quais os fatores relacionados ao envelhecimento podem contribuir para determinar a forma clínica da COVID-19 leve, moderada ou grave.

3. O envelhecimento está geralmente associado ao aparecimento de doenças inflamatórias crônicas, ao aumento da suscetibilidade a infecções e à redução na capacidade de realizar várias atividades físicas e mentais. No entanto, algumas pessoas envelhecem sem doenças e preservam muitas dessas capacidades. Chamamos esse processo de “envelhecimento saudável” e essas pessoas podem desenvolver uma forma assintomática ou leve da COVID-19 se forem infectados.

4. O médico fará perguntas a respeito da sua saúde, dos seus hábitos, da sua moradia e da sua família como parte do exame clínico a que você será submetido como rotina de atendimento. Um pesquisador também fará algumas perguntas, através de um pequeno questionário, sobre a sua alimentação. Você poderá se recusar a responder qualquer pergunta que por ventura lhe causar algum constrangimento. Um tempo de aproximadamente 15 minutos será necessário para você responder a essas perguntas e ao questionário.

5. Além do exame clínico, serão necessários alguns testes para verificar o seu estado de saúde. Esses testes serão feitos a partir da coleta de materiais biológicos: fezes (avaliação da microbiota intestinal e da presença de parasitoses intestinais), secreção nasal (para detecção do vírus Cov-2) e de sangue. As fezes serão coletadas por você mesmo(a) em sua casa e trazidas na próxima consulta. Serão fornecidas instruções do profissional da saúde sobre como coletar esse material. Todos os gastos decorrentes da coleta e entrega da amostra de fezes serão ressarcidos a você e ao seu acompanhante (quando necessário) pela equipe da pesquisa. A análise parasitológica e da microbiota serão feitas por empresas brasileiras que fazem esses tipos de análise.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Ana Maria Otaria

O sangue será coletado do seu braço e será utilizado para a realização de outros testes como, por exemplo, o hemograma (que mostra a contagem dos glóbulos vermelhos e brancos), o teste de ELISA para medir anticorpos e outras substâncias presentes no sangue como as citocinas que irão mostrar como o seu organismo se defende de infecções, por exemplo. Será necessário coletar cerca de 40 mL do seu sangue.

Para o exame que detecta a presença do coronavírus, um membro da equipe irá coletar secreção de ambas as narinas ou da faringe utilizando um cotonete (*swab*). Esse cotonete será introduzido com cuidado e por um tempo curto, mas o processo causa algum desconforto. Depois o cotonete contendo o material coletado será introduzido em um tubo contendo solução de inativação do vírus e todo o material será enviado para o teste.

6. Haverá coleta, transporte, armazenamento e utilização desse material biológico coletado somente para fins de pesquisa sendo que esse material será destruído após a utilização ou o fim da pesquisa. Caso haja intenção de uso do seu sangue/fezes em pesquisas futuras ou compartilhamento com outras instituições você será consultado antes.

7. O sangue será coletado por profissional treinado que usará jaleco, máscara, óculos de proteção e luvas. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local podendo, em alguns casos, levar à formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderão ocorrer outros tipos de desconforto a você como tonturas e desmaios, ou desconfortos psíquicos como ansiedade e medo. Isto será levado em conta no momento da coleta e, caso seja necessário, será providenciada uma coleta na posição deitada para evitar qualquer tipo de desconforto, constrangimento ou aborrecimento. A coleta da secreção nasal ou da faringe será feita por cotonetes (*swabs*) e ela causa algum desconforto. O profissional responsável pela coleta é treinado para realizar o procedimento, a fará de maneira cuidadosa e por um tempo curto para minimizar esse desconforto. A coleta das fezes será realizada em casa por você mesmo e o material será trazido ao hospital. Essa coleta não apresenta nenhum risco para a sua saúde, mas pode lhe causar constrangimento.

8. Medidas de biossegurança são adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto visando salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação e também evitar injúria ao paciente no ato da coleta de sangue por punção venosa. Serão observadas medidas de segurança também para acidentes cortantes ou perfurantes e os riscos de contaminação são minimizados com a realização de antissepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto. Com relação à coleta das fezes, ela não apresenta nenhum risco para a sua saúde e será realizada em sua casa para evitar qualquer tipo de constrangimento.

9. Caso os resultados dos exames laboratoriais sejam positivos para SARS-Cov2 você será informado em poucos dias. Se o exame for positivo para parasitoses, você será orientado adequadamente e encaminhado para tratamento gratuito. Os resultados relativos ao seu hemograma (contagem de células no sangue) também serão entregues a você e fornecidas explicações com relação a esses resultados.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Ana Maria Maria

10. Você não é obrigado a fazer os exames ou a doar seu sangue. A recusa não lhe causará nenhum prejuízo, nenhum gasto e não irá alterar a forma como você será atendido na unidade de saúde ou hospital.

11. Suas amostras de sangue e fezes serão processadas no Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (em Belo Horizonte), na Universidade Federal de Juiz de Fora (em Governador Valadares) e na Universidade de São Paulo (em São Paulo) e transferidas posteriormente para armazenamento no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (em Belo Horizonte), por um período máximo de 10 anos, sendo utilizadas para análises desta pesquisa. Essas amostras também poderão ser utilizadas em outras pesquisas, mas você será consultado(a) antes de isso ocorrer. As amostras serão destruídas após a realização da atual pesquisa ou, com seu consentimento, em pesquisas futuras.

12. A sua participação como voluntário não será remunerada. Será oferecido, ao participante da pesquisa, o resultado do exame de PCR para SARS-Cov2 em poucos dias e também o acesso a todas as informações sobre a sua saúde imunológica (que será examinada pelos testes que faremos ao longo do projeto). Esses resultados serão entregues a você ao final do estudo, caso você queira requisitá-los à equipe da pesquisa. O contato com a equipe e o prazo para essa requisição serão entregues a você após o atendimento. Serão garantidos também todos os cuidados necessários para sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem-estar físico e psicológico e você poderá retirar-se desta pesquisa em qualquer momento, sem que isto lhe cause qualquer prejuízo ou constrangimento. Todos os participantes terão direito a receber indenização por quaisquer danos à sua saúde comprovadamente provenientes dos procedimentos relacionados à pesquisa.

13. Este estudo contribuirá para a identificação de fatores biológicos responsáveis pelas formas leves ou graves da doença causada pelo vírus SARS-Cov-2.

14. Serão garantidos o sigilo e a privacidade das informações, sendo reservado a você o direito de não se identificar.

15. Na apresentação dos resultados, seu nome não será citado, nem daquele pelo qual você é responsável. Sua identificação será mantida em sigilo durante todo o estudo e apenas a coordenadora do projeto manterá essa informação guardada em arquivo seguro.

16. A sua participação é importante, pois auxiliará na busca dos fatores envolvidos no desenvolvimento das formas leves ou graves da COVID-19 e na elaboração de medidas que ajudem a identificar os indivíduos que desenvolverão a forma grave de forma rápida. Isto possibilitará o tratamento da doença no seu início melhorando as chances de boa recuperação.

17. Caso queira, você também pode tirar dúvidas sobre o projeto com as pesquisadoras responsáveis Dra. Ana Maria Caetano de Faria (coordenadora geral do projeto e professora da UFMG) no telefone/whatsapp (31) 99741-0793 Dra. Gabriela Silveira Nunes Abreu (coordenadora do projeto em Governador Valadares e professora da UFJF) no telefone/whatsapp (33)99180-0050; ou Dra. Rosana Richtmann (médica infectologista responsável pelo atendimento no Instituto de Infectologia Emílio Ribas em São Paulo) no telefone/whatsapp (11) 99944-4507.

Rubricas (pesquisador/participante ou responsável)

Ana Maria Caetano

Nome do Participante: _____

Eu _____, concordo em participar da pesquisa, sob a responsabilidade dos coordenadores deste projeto, de forma livre e voluntária. Declaro que fui devidamente informado (a) sobre a pesquisa, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios da mesma. O sigilo e a possibilidade de retirada do estudo também me foram devidamente informados.

Consentimentos Opcionais:

- () Eu concordo que meu material biológico seja utilizado apenas para esta pesquisa.
 () Eu concordo que meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas também, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro TCLE, que dará explicações sobre como e para que o meu material biológico será utilizado.
 () Eu autorizo os pesquisadores envolvidos na pesquisa a consultarem os dados do meu prontuário médico para obter informações referentes à minha saúde. Essas informações permanecerão sigilosas e sob a guarda do pesquisador responsável pelo estudo.

Governador Valadares/Belo Horizonte/São Paulo, ____ de _____ de 20__.

 Assinatura do Participante ou Responsável

Ana Maria Caetano

 Assinatura do Coordenador do Projeto de Pesquisa

Identificação do Responsável pela Pesquisa

| |
|--|
| <p>Pesquisador Responsável: Profª. Dra. Ana Maria Caetano de Faria</p> |
| <p>Instituição de Origem da Pesquisa: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Bioquímica e Imunologia Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG Tel: 31-3409-2630 / 2640 Fax: 31- 3409-2640</p> |
| <p>Comitê de Ética em Pesquisa: Comitê de Ética da UFMG Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 - CEP: 31270-901 - Belo Horizonte - MG Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@prpq.ufmg.br</p> |

Ana Maria Caetano

ANEXO 2: Projeto Aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da imunossenescência no desfecho da COVID19.

Pesquisador: Ana Maria Caetano de Faria

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 3

CAAE: 40208320.3.1001.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: MERCK SHARP & DOHME FARMACEUTICA LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.522.282

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537837.pdf, de 29/01/2021).

RESUMO

A atual pandemia de COVID19 é um grande desafio para a ciência por vários motivos. Um deles é o padrão dos grupos de risco que atinge indivíduos com co-morbididades (diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade) e idosos. De fato, doenças inflamatórias crônicas podem comprometer a resposta imune e o envelhecimento é associado a várias alterações imunológicas que tornam os idosos mais suscetíveis a infecções. No entanto, no Brasil, 25% das mortes por COVID19 ocorrem em indivíduos < 60 anos e sem as doenças listadas como de risco em outros países. Por outro lado, nem todos os idosos desenvolvem a forma grave da doença. Nossa hipótese a ser estudada nesse projeto é que alguns defeitos imunes típicos da imunossenescência podem ocorrer em idosos e em adultos e eles seriam importantes para o desfecho grave da COVID19:

a) a inflamação crônica de baixa intensidade associada ao envelhecimento (inflamm-aging) pode potencializar a tempestade de citocinas que leva às lesões da microcirculação e do pulmão observada nos casos graves de COVID19;

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

b) a senescência/exaustão de linfócitos T CD8+ pode comprometer a função dessas células na imunidade anti-viral;

c) a redução na função de células T e B imunorreguladoras (tregs e Bregs) pode comprometer o controle da inflamação pulmonar;

d) a redução da diversidade de repertório das imunoglobulinas (Ig) de células B típica da imunossenescência pode comprometer o controle da infecção;

e) indivíduos de áreas endêmicas como Governador Valadares (GV) teriam um padrão acentuado de imunossenescência devida à exposição crônica a infecções que aceleraria a senescência imunológica;

f) outros fatores inflamatórios sistêmicos como a disbiose da microbiota intestinal e a obesidade, poderiam atuar potenciando os danos pulmonares na COVID19 grave. Para testar essa hipótese pretendemos avaliar em coortes de adultos (20-60 anos) e idosos (>60) com COVID19 de Belo Horizonte, Governador Valadares, São Paulo e Salvador:

- 1) perfil inflamatório sistêmico (27 citocinas/quimiocinas no plasma);
- 2) fenótipo de senescência em linfócitos T e B no sangue (PBMC);
- 3) repertório de Imunoglobulinas produzidas por linfócitos B ativados;
- 4) outros fatores inflamatórios (obesidade, microbiota, nutrição, co-morbidades);
- 5) a idade biológica medida pela metilação do DNA extraído de leucócitos (em comparação com a idade cronológica) dos indivíduos estudados. A intenção é relacionar o perfil de imunossenescência desses indivíduos com o desfecho clínico da doença procurando identificar biomarcadores da forma grave da COVID19.

HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que o declínio na função imunológica observado em idosos (inflamação resultante do aumento da secreção de citocinas inatas, declínio na função de células TCD4+ reguladoras aumento da frequência de células TCD8+ e T CD4+ exaustas/senescentes, disbiose da microbiota intestinal e alterações no repertório de anticorpos) têm um papel crítico no desencadeamento da hiper-inflamação que resulta em danos nos pulmões e na microcirculação com o desencadeamento síndrome respiratória grave (SARS) e da COVID-19 grave nessa população. Além disso, propomos que indivíduos residentes em uma área endêmica de várias doenças infecciosas crônicas (Governador Valadares, MG, Brasil) teriam aumentado a suscetibilidade ao desenvolvimento de formas graves de COVID-19 em idade mais precoce devido a um fenótipo de envelhecimento acelerado observado nessa área. Indivíduos com o perfil de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-6877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

senescência acelerada, em geral, teriam uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento da forma grave da doença.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal, no qual serão recrutados 150 indivíduos positivos para SARS-Cov-2 (os negativos serão o nosso grupo controle) de ambos os sexos de duas faixas etárias (adultos de 20 a 60 anos e idosos > 60 anos), residentes na área urbana de Governador Valadares e nas cidades de Belo Horizonte e São Paulo. Serão selecionados os indivíduos que forem positivos para o teste molecular (RTPCR) para SARS-Cov2 e estes serão divididos em 4 grupos de estudo: adultos ou idosos com as formas leve/moderada ou grave da COVID-19. Os indivíduos que aceitarem participar da pesquisa deverão assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE, os indivíduos responderão o questionário de anamnese clínica, socioeconômica e nutricional aplicados pelos médicos e nutricionistas da equipe. Posteriormente o indivíduo passará para a coleta de medidas antropométricas e coleta de 40mL de sangue periférico e receberá vasilhame e instruções para colher uma amostra de fezes em casa e entregá-la no retorno para receber o resultado. O sangue será processado tendo a porção celular (células mononucleares) será separada e utilizada para: 1) avaliação das características fenotípicas dos linfócitos T e B (perfil de imunossenescência e de imunoregulação) descritas nos objetivos pela técnica de citometria de fluxo; extração do RNA para avaliação do repertório de imunoglobulinas; 2) extração do DNA para avaliação da metilação (determinação da idade epigenética). O soro será utilizado para medida de anticorpos para SARSCov2 e para testes bioquímicos, o plasma será utilizado para medida do perfil de citocinas/quimocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (inflammaging) pela técnica de Luminex. Exames bioquímicos como hemograma, leucograma, medida de Proteína C Reativa, Dímero D também serão realizados. As fezes serão utilizadas para os testes parasitológicos e para a microbiota intestinal (por sequenciamento do DNA extraído). Serão utilizados métodos de estatística de análise multivariada e ferramentas de bioinformática para determinar as correlações entre essas análises e o desfecho da COVID-19 (leve/moderado versus grave) nas duas faixas etárias examinadas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídos todos os indivíduos maiores de 20 anos atendidos nas unidades parceiras do projeto que apresentarem confirmação para a presença do Cov-2 e que aceitarem participar do estudo por meio da assinatura do TCLE. Alguns indivíduos que foram negativos no teste de PCR

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

para SARS-Cov2 serão também incluídos como controle do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

Avaliar como o perfil imunológico relacionado ao envelhecimento impacta no desfecho da COVID19 de modo a tornar essa população mais susceptível ao agravamento da doença para poder identificar biomarcadores que possam permitir um diagnóstico precoce dessa forma grave da doença. Para isso serão avaliados os seguintes parâmetros na população estudada:

- 1) o perfil de ativação linfócitos T e B, identificar se essas células apresentam maior grau de envelhecimento/ exaustão celular, se mantem a capacidade de proliferação e de diferenciação em células reguladoras, bem como na atividade das células reguladoras;
- 2) o perfil de citocinas/quimiocinas inflamatórias (inflammaging) no plasma dos pacientes infectados, e o balanço com as citocinas anti-inflamatórias;
- 3) o repertório de imunoglobulinas nos indivíduos em diferentes faixas etárias e com diferentes desfechos da doença;
- 4) as diferenças no perfil de composição da microbiota intestinal entre os diferentes grupos;
- 5) as comorbidades inflamatórias associadas ao perfil de imunossenescência e sua correlação com o desfecho da COVID-19.
- 6) Por fim, tentar encontrar um biomarcador de resposta imune que possa ser utilizado como critério de diagnóstico e prognóstico da doença.

OBJETIVO SECUNDÁRIO

Produzir um banco de dados com os resultados de todas as análises realizadas no projeto para facilitar a interpretação dos resultados globais e auxiliar em pesquisas futuras envolvendo a imunossenescência e os perfis imunológicos relacionados a ela e correlacionados com infecções virais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

O sangue será coletado por profissional treinado que usará jaleco, luvas e máscara. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local podendo, em alguns casos, levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderão ocorrer outros tipos de desconforto como tonturas e desmaios, ou desconfortos psíquicos como ansiedade e medo. Isto será levado em conta no momento da coleta e, caso seja necessário, será providenciada uma coleta na posição deitada para evitar qualquer tipo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

de desconforto, constrangimento ou aborrecimento. Medidas de biossegurança serão adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto visando salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação e também evitar injúria ao paciente no ato da coleta de coleta de sangue por punção venosa. Serão observadas medidas de segurança também para acidentes cortantes ou perfurantes e os riscos de contaminação são minimizados com a realização de antissepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto.

BENEFÍCIOS

A participação da pessoa como voluntária não será remunerada. Um benefício imediato da participação será a realização gratuita do teste diagnóstico por RT-PCR para SARS-Cov2 com resultado a ser informado em 2 -3 dias. Para os indivíduos de Governador Valadares, será fornecido gratuitamente o resultado do exame parasitológico de fezes. Além disto, todas as avaliações realizadas inclusive o perfil inflamatório do plasma, o perfil celular de imunossenescência, o perfil da microbiota intestinal e a predição da idade biológica (epigenética) dos indivíduos analisados serão disponibilizadas ao final do estudo, mediante solicitação de quem se interessar, para o informar ao indivíduo sobre seu estado de saúde. Além disto, a participação de cada um será fundamental para descobrirmos os fatores de risco relacionados à infecção pelo SARS-Cov-2 e para a busca de novas medidas de controle dessa pandemia e de outras infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo transversal, no qual serão recrutados indivíduos suspeitos de infecção pelo Cov-2 de ambos os sexos nas seguintes faixas etárias: a) 25-60 anos e b) > 60 anos, residentes nos municípios de Governador Valadares, Belo Horizonte e São Paulo. Esses dois grupos etários serão subdivido em 2 grupos de acordo com o desfecho da COVID-19 (forma leve-moderada e forma grave). Os dados clínicos dos voluntários incluindo anamnese completa contendo a história pregressa de saúde, comorbidades e uso de medicamentos serão coletados do prontuário médico disponível nos locais de recrutamento e a coleta desses dados assim como o acompanhamento clínico dos pacientes estarão a cargo dos médicos responsáveis pelo atendimento em cada um dos hospitais parceiros do estudo.

Braços do estudo:

- 20-60 anos (coleta de secreção oronasal, fezes e sangue).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

- Acima de 60 anos (coleta de secreção oronasal, fezes e sangue).

Patrocinador: MERCK SHARP & DOHME FARMACÊUTICA LTDA

Número de participantes incluídos no Brasil: 150

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF, Universidade de São Paulo, Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Haverá armazenamento de amostras: O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer -80°C (plasma, fezes e células mononucleares do sangue periférico PBMC) no Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), sob a coordenação da Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria, até sua utilização. Isso ocorrerá com as amostras coletadas em Belo Horizonte, Governador Valadares e São Paulo que serão armazenadas até o momento de análise dos parâmetros imunológicos e genéticos como proposto no protocolo de pesquisa. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será de, no máximo, 10 anos para todas as amostras biológicas.

Previsão de início do estudo: 01/02/2021

Previsão de encerramento do estudo: 01/09/2022.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao parecer pendente nº 4.515.190 emitido pela Conep em 29/01/2021:

1. Em relação ao projeto de pesquisa detalhado (arquivo intitulado "Protocolo_de_pesquisa_17_Nov_20.pdf"):

1.1. O projeto de pesquisa não é claro em definir o local onde os voluntários serão abordados para recrutamento, sendo incerto se esta etapa ocorrerá na unidade de emergência, unidade ambulatorial ou unidade de internação das instituições participantes. Solicitam-se esclarecimentos e adequação do protocolo.

RESPOSTA: No Protocolo de Pesquisa, página 16, esclarecemos o local onde os participantes serão

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

abordados e onde ocorrerá a coleta de sangue: "O local de abordagem dos futuros participantes da pesquisa serão as unidades ambulatoriais, de internação e de emergência onde eles serão atendidos. Equipes distintas do projeto de pesquisa estarão preparados para a abordagem dos indivíduos nesses locais. Para os indivíduos que procurem o atendimento com sintomas de "síndrome gripal", os locais de atendimento e recrutamento serão os ambulatórios das instituições participantes. Para os indivíduos com sintomas respiratórios graves, os locais de atendimento e recrutamento serão as unidades de emergência e de internação das instituições participantes".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Em relação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (documento intitulado "TCLE_Projeto_COVID_Imunossenescencia_V2"):

2.1. Lê-se na página 1 de 4: "O tempo de duração desta pesquisa será de 22 meses, sendo que a coleta de dados terá início em Fevereiro de 2021 e término em Novembro de 2022". O trecho, tal qual disposto, pode induzir o participante a erro, fazendo-o acreditar que sua participação no estudo será de 22 meses, quando, na verdade, o tempo refere-se ao estudo como um todo. Solicita-se adequação do trecho, tornando claro o tempo em que o participante permanecerá no estudo.

RESPOSTA: Na página 1 (Item 1) foi acrescentada uma frase explicando qual o tempo de participação do voluntário na pesquisa: "A sua participação no estudo ocorrerá no período do atendimento até o desaparecimento dos sintomas da doença caso a infecção pelo SARS-CoV2 seja confirmada. Se o resultado do teste para o SARS-CoV2 for negativo, sua participação se encerrará depois da coleta do material biológico (sangue e fezes)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Lê-se na página 1 de 4: "As fezes serão coletadas por você mesmo(a) em sua casa e trazidas na próxima consulta". Levando-se em consideração que nem todos os participantes da pesquisa atendidos por suspeita de COVID-19 nas unidades de emergência terão seguimento ambulatorial (sobretudo aqueles com doenças mais leves), entende-se que o retorno ao hospital para a entrega do material biológico não faz parte da rotina assistencial, mas do protocolo de pesquisa, havendo necessidade de ressarcir os gastos relacionados. Diante do exposto, solicita-se que o pesquisador assegure o direito de ressarcimento ao participante da pesquisa (e ao acompanhante, quando for necessário) de todos os gastos decorrentes da pesquisa.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-6877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

- Acima de 60 anos (coleta de secreção oronasal, fezes e sangue).

Patrocinador: MERCK SHARP & DOHME FARMACÊUTICA LTDA

Número de participantes incluídos no Brasil: 150

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF, Universidade de São Paulo, Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Haverá armazenamento de amostras: O material biológico constituinte do Biorrepositório será mantido em freezer -80° C (plasma, fezes e células mononucleares do sangue periférico PBMC) no Laboratório de Imunobiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG), sob a coordenação da Profa. Dra. Ana Maria Caetano de Faria, até sua utilização. Isso ocorrerá com as amostras coletadas em Belo Horizonte, Governador Valadares e São Paulo que serão armazenadas até o momento de análise dos parâmetros imunológicos e genéticos como proposto no protocolo de pesquisa. O prazo de armazenamento do Biorrepositório será de, no máximo, 10 anos para todas as amostras biológicas.

Previsão de início do estudo: 01/02/2021

Previsão de encerramento do estudo: 01/09/2022.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise de respostas ao parecer pendente nº 4.515.190 emitido pela Conep em 29/01/2021:

1. Em relação ao projeto de pesquisa detalhado (arquivo intitulado "Protocolo_de_pesquisa_17_Nov_20.pdf"):

1.1. O projeto de pesquisa não é claro em definir o local onde os voluntários serão abordados para recrutamento, sendo incerto se esta etapa ocorrerá na unidade de emergência, unidade ambulatorial ou unidade de internação das instituições participantes. Solicitam-se esclarecimentos e adequação do protocolo.

RESPOSTA: No Protocolo de Pesquisa, página 16, esclarecemos o local onde os participantes serão

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|----------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537837.pdf | 29/01/2021 16:35:49 | | Aceito |
| Outros | Carta_CONEP_Jan_2021.pdf | 29/01/2021 16:34:01 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Projeto_COVID_Imunossenescencia_V3.pdf | 29/01/2021 16:32:21 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Brochura Pesquisa | Protocolo_de_pesquisa_CONEP_29_Jan_21.pdf | 29/01/2021 16:31:27 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Outros | Termo_Biorrepositorio.pdf | 18/11/2020 15:14:36 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_Anuencia_Unimed.pdf | 18/11/2020 15:12:03 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_Rosto.pdf | 18/11/2020 15:11:33 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_de_Anuencia_IIER.pdf | 17/11/2020 16:46:00 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Parecer_Projeto_Pesquisa_Ana_Faria_2020.pdf | 17/11/2020 16:43:29 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termo_Anuencia_UFJF.pdf | 17/11/2020 16:33:45 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Parecer_Risoleta_Impacto_Imunossenescencia.pdf | 17/11/2020 16:33:02 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Declaração do Patrocinador | Patrocinador_60383_Faria_Committee_Decision_Letter.pdf | 17/11/2020 16:30:28 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Termo_Anuencia_FIOCRUZ_BH.pdf | 17/11/2020 16:28:04 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCDU_Projeto_COVID_Nov_2020.pdf | 17/11/2020 16:25:04 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |
| Declaração de concordância | Termo_Anuencia_USP.pdf | 17/11/2020 16:16:16 | Ana Maria Caetano de Faria | Aceito |

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.522.282

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 03 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

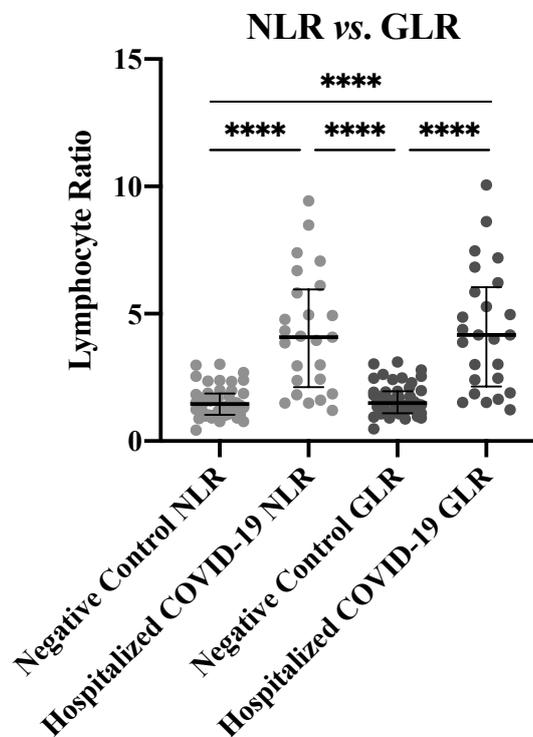
Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

ANEXO 3

| 297 Indivíduos Analisados | | |
|---------------------------|---|---|
| | <i>Bayer ADVIA 60 Hematology Analyzer</i> (% de granulócitos totais) | <i>Sysmex XN-550</i> (Discriminação de granulócitos) |
| Controle Negativo (51) | 47 (92,15%) | 4 (7,84%) |
| Síndrome Gripal (94) | 94 (100%) | 0 (0%) |
| COVID-19 Leve (101) | 101 (100%) | 0 (0%) |
| COVID-19 Internados (51) | 32 (62,74%) | 19 (37,25%) |

Anexo 3. Tabela indicando a quantidade de amostras processadas em cada analisador hematológico (Bayer ADVIA 60 ou Sysmex XN-550), subdividida por grupos.

ANEXO 4



Anexo 4. Comparação da razão de neutrófilo por linfócitos (NLR) com a razão de granulócitos por linfócitos (GLR) dos mesmos indivíduos dos grupos Controle Negativo e COVID-19 Internados. Os dados estão apresentados como gráficos de dispersão de pontos, destacando-se a mediana dos valores.