



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ANÁLISES CLÍNICAS

ALEX LOPES DE MENEZES OLIVEIRA

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O QUANTITATIVO DE LINFÓCITOS
GRANDES GRANULARES E O AUMENTO NA DOSAGEM DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS INESPECÍFICOS EM PACIENTES
CONFORME POSITIVIDADE PARA COVID-19 E SOBREVIVÊNCIA**

Niterói, RJ

2023

ALEX LOPES DE MENEZES OLIVEIRA

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O QUANTITATIVO DE LINFÓCITOS
GRANDES GRANULARES E O AUMENTO NA DOSAGEM DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS INESPECÍFICOS EM PACIENTES
CONFORME POSITIVIDADE PARA COVID-19 E SOBREVIVÊNCIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal Fluminense, como parte
das exigências do curso de Biomedicina para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina - Habilitação em Análises
Clínicas.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Hye Chung Kang

Coorientadora:

M Sc. Suelen de Brito Nascimento

Niterói, RJ

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

O48a Oliveira, Alex Lopes de Menezes
ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O QUANTITATIVO DE LINFÓCITOS
GRANDES GRANULARES E O AUMENTO NA DOSAGEM DE MARCADORES
INFLAMATÓRIOS INESPECÍFICOS EM PACIENTES CONFORME POSITIVIDADE
PARA COVID-19 E SOBREVIVÊNCIA / Alex Lopes de Menezes
Oliveira. - 2023.
39 p.: il.

Orientador: Hye Chung Kang.
Coorientador: Suelen de Brito Nascimento.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Universidade
Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2023.

1. Hematologia. 2. Linfócitos Grandes Granulares. 3.
Marcadores Inflamatórios Inespecíficos. 4. COVID-19. 5.
Produção intelectual. I. Kang, Hye Chung, orientadora. II.
Nascimento, Suelen de Brito, coorientadora. III. Universidade
Federal Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD - XXX

ALEX LOPES DE MENEZES OLIVEIRA

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE O QUANTITATIVO DE LINFÓCITOS
GRANDES GRANULARES E O AUMENTO NA DOSAGEM DE
MARCADORES INFLAMATÓRIOS INESPECÍFICOS EM PACIENTES
CONFORME POSITIVIDADE PARA COVID-19 E SOBREVIVÊNCIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal Fluminense, como parte
das exigências do curso de Biomedicina para
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina - Habilitação em Análises
Clínicas.

Aprovado em ___ de _____ de ____.

Professora Dr^a. Hye Chung Kang - UFF (Orientadora)

Professor Dr. Guilherme Wataru Gomes - UFF (Titular)

Professora Dr^a. Isabela Resende Pereira - UFF (Titular)

Professora Dr^a. Thalia Medeiros Tito Avelar - UFF (Suplente)

A meus pais, Deise e Jorge, que me impulsionaram em toda jornada, não só acadêmica. Também dedico a Rayssa, minha irmã, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me cercar de pessoas que me fazem bem, me fortalecer e me acompanhar em toda minha trajetória.

Em segundo lugar, agradeço a toda a minha família que buscou me proporcionar sempre as melhores condições possíveis para que eu pudesse concluir esta etapa. Gostaria de agradecer especialmente a minha madrinha, Maria de Fátima, que independente da distância ou circunstância, sempre buscou me apoiar e orientar de diversas maneiras objetivando meu sucesso.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório de hematologia do Hospital Universitário Antônio Pedro, que me receberam com muito carinho e me ajudaram a compreender ainda mais essa disciplina, além dos diversos momentos que enriqueceram minha jornada de maneira substancial.

Agradeço às minhas amigas Milena, Yngrid e Paula, que foram cruciais para me estabilizarem nos momentos mais difíceis nesta etapa final.

Agradeço ao Gunnar, que por já ter vivenciado este momento, me adiantou diversas crises que poderiam surgir e esteve sempre presente em momentos de pane.

Por fim, quero agradecer especialmente a Prof^a Hye, que sempre em sequência ao caso de eu não saber responder alguma pergunta, pacientemente me explicava cada detalhe de alguma técnica ou conhecimento. Também devo este a Suelen, que foi uma âncora para que eu não me distanciasse de meu objetivo e a Mariana, por todo apoio, ajuda e claro, cafés feitos, para que eu não sucumbisse ao sono durante a escrita.

Eu não falhei. Acabei de encontrar 10.000
maneiras que não funcionam.

Thomas A. Edison

RESUMO

O sistema imunológico abrange diversas células, órgãos linfoides, fatores humorais e inúmeras citocinas que trabalham constantemente em conjunto com o intuito de proteger o organismo contra patógenos e lesões, mantendo a homeostase. Existem duas partes distintas da imunidade, a resposta inata e a adaptativa, cada qual com diferentes níveis de rapidez e especificidade na reação. Embora distintas, a imunidade inata e adaptativa trabalham em conjunto interagindo entre si a todo o momento. Além disso, diversas células dentro desse sistema ainda são difíceis de serem classificadas, dentre elas, as células *natural killer*, as quais em sua maioria são consideradas linfócitos grandes granulares junto a uma pequena parte de linfócitos T citotóxicos. Desde março de 2020, com o início da pandemia de COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2, a comunidade científica tem investigado como as alterações nas células sanguíneas podem afetar o prognóstico dos pacientes infectados. Com esse propósito, este trabalho buscou correlacionar o número de linfócitos grandes granulares com a dosagem de alguns marcadores inflamatórios inespecíficos reportados como aumentados em pacientes infectados em estado grave, como a proteína C reativa e a ferritina. Embora a correlação do LGG com esses dois marcadores inflamatórios não tenha sido estatisticamente significativa, foi encontrada outras correlações como a de LGG com monócitos e com eosinófilos no grupo de pacientes que não sobreviveram a internação.

Palavras-chave: proteína C reativa; ferritina; SARS-CoV-2; células *natural killer*.

ABSTRACT

The immune system encompasses several cells, lymphoid organs, humoral factors and numerous cytokines that constantly work together in order to protect the organism against pathogens and injuries, maintaining homeostasis. There are two distinct parts of immunity, the innate and the adaptive response, each with different levels of speed and specificity in reaction. Although distinct, innate and adaptive immunity work together, interacting with each other at all times. In addition, several cells within this system are still difficult to classify, among them, natural killer cells, which are mostly considered large granular lymphocytes together with a small part of cytotoxic T lymphocytes. Since March 2020, with the onset of the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus, the scientific community has been investigating how changes in blood cells can affect the prognosis of infected patients. With this purpose, this work seeks to correlate the number of large granular lymphocytes with the dosage of some nonspecific inflammatory markers reported as increased in critically infected patients, such as C-reactive protein and ferritin. Although the correlation between LGG and these two inflammatory markers was not statistically significant, other correlations were found, such as LGG with monocytes and eosinophils in the group of patients who did not survive hospitalization.

Key Words: C-reactive protein; ferritin; SARS-CoV-2; natural killer cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figura 1 | Linfócito grande granular | 15 |
| Figura 2 | Dosagem de PCR entre os grupos conforme positividade para COVID-19. | 27 |
| Figura 3 | Dosagem de ferritina entre os grupos conforme positividade para COVID-19. | 28 |
| Figura 4 | Quantidade de LGG entre os grupos conforme positividade para COVID-19. | 28 |

QUADROS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Quadro 1 | Valores hematológicos de referência para leucócitos no hemograma distribuídos por idade | 17 |
| Quadro 2 | Valores hematológicos de referência para série branca no hemograma distribuídos por idade | 18 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabela 1 | Dados gerais dos pacientes com COVID-19..... | 26 |
| Tabela 2 | Dados gerais dos pacientes sem COVID-19..... | 27 |
| Tabela 3 | Características laboratoriais da população estudada conforme positividade para COVID-19 em pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro | 29 |
| Tabela 4 | Características laboratoriais da população estudada conforme a sua sobrevivência em pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro | 30 |
| Tabela 5 | Correlação ρ de Spearman entre LGG e os índices do hemograma no grupo de pacientes não sobreviventes | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS`

| | |
|--------------------------------|--|
| COVID-19 | <i>Corona Virus Disease - 19</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| HUAP | Hospital Universitário Antônio Pedro |
| IL | Interleucina |
| LGG | Linfócito grande granular |
| n | Número amostral |
| NETs | Armadilhas extracelulares de neutrófilos |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| PCH | Fosfocolina |
| PCR | Proteína C reativa |
| PLT | Plaquetas |
| RBC | Glóbulos vermelhos |
| SARS-CoV-2 | Síndrome respiratória aguda grave |
| SBAC | Sociedade Brasileira de Análises Clínicas |
| SI | Sistema Imune |
| SPSS | Statistical Package for the Social Science |
| TLRs | <i>Toll like receptors</i> |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alfa |
| UTI | Unidade de tratamento intensivo |
| WBC | Glóbulos brancos |
| ρ | rho |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Sistema Imunológico | 13 |
| 1.2 Imunidade Inata | 13 |
| 1.3 Imunidade Adaptativa | 14 |
| 1.4 Células <i>Natural Killer</i> e Linfócitos Grandes Granulares | 14 |
| 1.5 Hemograma | 16 |
| 1.6 Leucograma | 16 |
| 1.6 SARS-Cov-2 e Marcadores Inflamatórios Inespecíficos | 19 |
| 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO | 21 |
| 3 OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 Objetivo Geral | 22 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 4.1 Aspectos Éticos | 22 |
| 4.2 Coleta de Dados | 22 |
| 4.3 Levantamento de dados | 23 |
| 4.4 Amostras | 23 |
| 4.5 Dosagem da proteína-C reativa (PCR) | 24 |
| 4.5.1 Princípio do Teste: Imunoturbidimétrico com Látex: | 24 |
| 4.6 Dosagem de Ferritina | 24 |
| 4.6.1 Princípio do Teste: Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA): | 24 |
| 4.7 Hemograma | 25 |
| 4.8 Leitura das Lâminas | 25 |
| 4.9 Análise Estatística | 25 |
| 5 RESULTADOS | 26 |
| 6 DISCUSSÃO | 32 |
| 7 CONCLUSÃO | 36 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imunológico

Estamos constantemente expostos a uma variedade de organismos, alguns dos quais podem causar doenças devido à sua patogenicidade ou às reações de defesas do nosso corpo. O responsável por esses mecanismos de defesas supracitados é o sistema imunológico (SI), composto por órgãos linfoides, células, proteínas e citocinas que trabalham juntos para identificar, combater e eliminar patógenos e outras substâncias estranhas ao nosso organismo (PARKIN; COHEN, 2001).

O SI nunca está realmente em repouso, pois é caracterizado por um equilíbrio dinâmico entre diferentes tipos de respostas imunes, que são concorrentes e mutuamente inibitórias. A saúde é determinada pelo equilíbrio entre esses tipos de resposta, e isso significa que a resistência à infecção é em parte determinada pelo estado do SI antes da infecção. Por exemplo, o tipo de resposta imune envolvida na infecção primária pode conferir resistência ou suscetibilidade a uma infecção subsequente, dependendo dos tipos de respostas envolvidas pelos dois agentes infecciosos. Em outras palavras, o estado do SI é crucial para determinar a resistência a infecções (EBERL, 2016). O SI é dividido basicamente em dois tipos de imunidades: a imunidade inata e a imunidade adaptativa.

1.2 Imunidade Inata

A imunidade inata é assim chamada porque seus mecanismos de defesa são geneticamente codificados e transmitidos de geração em geração. Ela é composta por diferentes elementos, como o sistema complemento, células fagocíticas e receptores semelhantes a Toll (TLRs), que são não apenas essenciais para detectar e eliminar danos não próprios, mas também é fundamental para manter a homeostase do tecido normal, seja detectando e reparando tecidos danificados ou eliminando silenciosamente células senescentes promovendo a apoptose. Apesar disso, essa imunidade tem suas limitações, oferecendo apenas proteção imediata e sem memória de longo prazo. Além disso, seus receptores não possuem a especificidade molecular necessária para distinguir entre o próprio e o não próprio, o que pode levar a danos colaterais nos tecidos circundantes e no organismo como um todo (YATIM; LAKKIS, 2015). Por isso a imunidade inata, por si só, não é suficiente para garantir a proteção contra patógenos e outras ameaças.

1.3 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa é capaz de responder de maneira mais específica e efetiva a um patógeno. Isso ocorre porque ela possui linfócitos T e B que apresentam receptores de antígenos altamente específicos e que são capazes de reconhecer com precisão o agente infeccioso. Após a apresentação e reconhecimento do antígeno pela célula T ou B específica a ele, ocorre a ativação e diferenciação celular. Iniciando em seguida uma resposta efetora para combater a infecção, seja devido às células T ativadas deixando o tecido linfóide e se dirigindo para o local da infecção, ou devido à liberação de anticorpos de células B ativadas no sangue e fluidos teciduais (PARKIN; COHEN, 2001).

O sistema adaptativo possui um repertório extremamente diversificado de receptores de células T e anticorpos de células B, que ocorre no início do desenvolvimento dessas células, antes da exposição ao antígeno, gerando um repertório com mais de 10^8 receptores de células T e 10^{10} especificidades de anticorpos, o que permite sua capacidade de cobrir a grande variedade de patógenos que podem ser encontrados ao longo da vida (PARKIN; COHEN, 2001).

1.4 Células *Natural Killer* e Linfócitos Grandes Granulares

As células *natural killer* (NK) fazem parte da imunidade inata, diferente das células T e B da imunidade adaptativa, pois elas não rearranjam seus genes para codificar receptores de antígenos específicos, como as células T e B fazem (RIBATTI, 2017).

Elas compõem cerca de 5% a 20% dos linfócitos na circulação periférica e estão envolvidas nas respostas contra vírus e tumores. As células NK são naturalmente citotóxicas e não precisam de exposição prévia ao antígeno para exercerem suas atividades antitumorais (ABEL; YANG, *et al.*, 2018). Elas podem secretar citocinas e quimiocinas que modulam a resposta imune do hospedeiro e/ou eliminar células infectadas ou transformadas por meio da liberação de substâncias citotóxicas, como perforinas e granzimas ou por via de receptores de morte celular (CALIGIURI, 2008).

Os linfócitos grandes granulares (LGG) correspondem a aproximadamente 10% a 15% do total de células mononucleares do sangue periférico de um adulto. A maioria dessas células é derivada da linhagem de células NK $CD3^-$ (85%), enquanto as restantes são provenientes da linhagem de linfócitos T $CD3^+$ (15%) (TERRA; MAIA, 2010). Em comparação com os

linfócitos típicos, os LGGs são maiores e contém grânulos peroxidase-negativos em seu extenso citoplasma (Figura 1). Esses grânulos contém proteínas importantes para as funções citotóxicas, tais como perforinas e granzimas, que são responsáveis por gerar poros na membrana plasmática da célula alvo e ativar a cascata de caspases (RIBATTI, 2017).

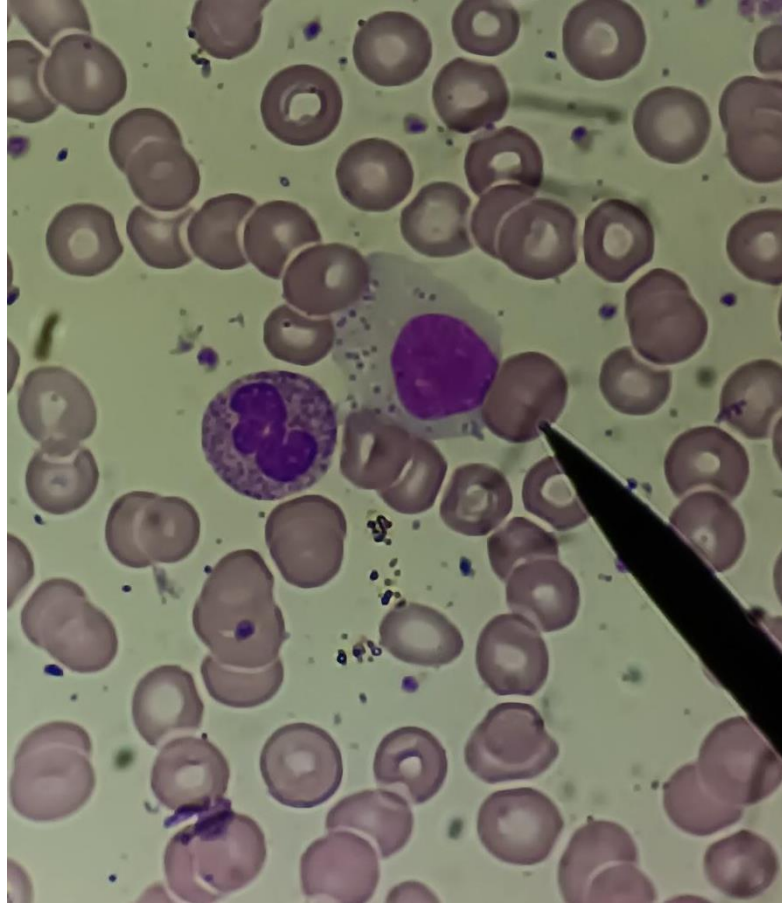


Figura 1. Linfócito grande granular. Aumento de 1000X no microscópio óptico. **Fonte:** Própria.

1.5 Hemograma

Segundo Celkan (2020), o hemograma é uma importante ferramenta utilizada pelos médicos como parte da avaliação do paciente. Como não é um exame caro, constitui uma parte significativa dos exames de rotina. Esse exame avalia o estado do sangue, que é composto de elementos figurados suspensos no meio fluido chamado plasma, que possui os fatores de coagulação como fibrinogênio, fatores V, VII. Os elementos sanguíneos maduros e formados envolvem hemácias (RBC), leucócitos (WBC) e plaquetas (PLT). É importante compreender este teste laboratorial para diagnósticos de infecções, anemias, cânceres hematológicos, estados hemorrágicos agudos, alergias e imunodeficiências, além de também ser utilizado para monitorar efeitos colaterais de certos medicamentos.

1.6 Leucograma

Sendo parte do hemograma, o leucograma avalia a série branca, entregando para o médico informações valiosas como quantidade absoluta, tamanho e porcentagem dos diferentes tipos de leucócitos presentes no sangue daquele paciente no momento em que a amostra foi colhida (CELKAN, 2020). Para que se possa avaliar o leucograma de maneira correta, deve-se atentar aos dados clínicos e histórico do paciente e correlacioná-los com os valores de referência. Aqui dispomos os valores de referência da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC em 2019, nos Quadros 1 e 2, referente aos leucócitos em geral, e suas classificações, respectivamente.

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, podem ser medulares, onde passam por um processo de maturação, ou circulantes no sangue periférico, onde geralmente estão já formados ou amadurecidos. Todos possuem papéis reguladores e efetores na resposta imune. Os glóbulos brancos do sangue periférico incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Por meio da corrente sanguínea e vasos linfáticos, essas células circulam continuamente por todo o corpo, possuindo capacidade de migrar através de tecidos para assim realizarem suas diversas funções fisiológicas, mas muitas vezes, essas células estão envolvidas em diversos processos patológicos (CARRICK; BEGG, 2008).

Os neutrófilos são células com potentes propriedades antimicrobianas, sendo os leucócitos mais abundantes no sistema imune inato. Possuem uma maquinaria propícia para eliminar patógenos a partir de vias inflamatórias, com liberação de produtos citotóxicos,

espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Porém, essa atividade antimicrobiana dos neutrófilos não deve ser mal interpretada como sendo específica contra microrganismos e deve ser vista de uma forma mais geral como biotóxica, pois além de combater infecções, os neutrófilos podem aproveitar sua maquinaria nociva em outros contextos, como o câncer. Essa intensa capacidade de agressão desse grupo celular muitas vezes acaba sendo responsável por gerar danos em tecidos saudáveis distantes da lesão (BURN; FOTI, *et al.*, 2021).

Quadro 1. Valores hematológicos de referência para leucócitos no hemograma distribuídos por idade.

| Idade | Leucócitos X 10⁹/L |
|--------------|--------------------------------------|
| Nascimento | 18,0 (10,0 - 26,0) |
| 3 dias | 15,0 (7,0 - 22,0) |
| 1 mês | 12,0 (5,0 - 19,0) |
| 2 meses | 10,0 (5,0 - 15,0) |
| 3 – 6 meses | 12,0 (6,0 - 18,0) |
| 1 ano | 11,0 (6,0 - 16,0) |
| 2 – 6 anos | 10,0 (5,0 - 15,0) |
| 6 – 12 anos | 9,0 (5,0 - 13,0) |
| Adultos | 7,0 (4,0 - 10,0) |

Fonte: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, 2019.

Monócitos e macrófagos possuem o importante papel de vincular a imunidade inata à imunidade adaptativa, por meio de sua atuação como células apresentadoras de antígenos, além de serem exímios fagócitos (CARRICK; BEGG, 2008). Também possuem capacidade de produzir mediadores que modulam a função imunológica (DE LA TORRE; GENARO, *et al.*, 2008). Macrófagos são derivados de monócitos, e estão presentes na maioria dos tecidos promovendo sua manutenção, principalmente naqueles que possuem alguma relação com filtração de fluidos como o baço, fígado, pulmões e nódulos linfáticos (ELOMAA; SANKALA, *et al.*, 1998).

Quadro 2. Valores hematológicos de referência para série branca no hemograma distribuídos por idade.

| Idade | Neutrófilos X 10 ⁹ /L | Linfócitos X 10 ⁹ /L | Monócitos X 10 ⁹ /L | Eosinófilos X 10 ⁹ /L | Basófilos X 10 ⁹ /L | Plaquetas X 10 ⁹ /L |
|----------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 0 - 1 dia | 4,0 - 14,0 | 3,0 - 8,0 | 0,5 - 2,0 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 150 - 450 |
| 3 dias | 3,0 - 5,0 | 2,0 - 8,0 | 0,5 - 1,0 | 0,1 - 2,0 | 0,02 - 0,1 | 210 - 500 |
| 1 mês | 3,0 - 9,0 | 3,0 - 16,0 | 0,3 - 1,0 | 0,2 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 210 - 650 |
| 2 meses | 1,0 - 5,0 | 4,0 - 10,0 | 0,4 - 1,2 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 210 - 650 |
| 3 - 6 meses | 1,0 - 6,0 | 4,0 - 12,0 | 0,2 - 1,0 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 200 - 550 |
| 1 ano | 1,0 - 7,0 | 3,5 - 11,0 | 0,2 - 1,0 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 200 - 550 |
| 2 - 6 anos | 1,5 - 8,0 | 6,0 - 9,0 | 0,2 - 1,0 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 200 - 450 |
| 6 - 12 anos | 2,0 - 8,0 | 1,0 - 5,0 | 0,2 - 1,0 | 0,1 - 1,0 | 0,02 - 0,1 | 180 - 400 |
| Adultos | 2,0 - 7,0 | 1,0 - 3,0 | 0,2 - 1,0 | 0,02 - 0,5 | 0,02 - 0,1 | 150 - 400 |

Fonte: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - SBAC, 2019.

Os eosinófilos são bem identificados por sua granulação específica de característica acidófila presente em seu citoplasma. Eles sintetizam, armazenam e secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Podem processar antígenos, estimular células T e promover respostas humorais interagindo com células B. Também podem funcionar como células apresentadoras de antígenos e regular processos associados à imunidade via células Th1 e Th2. Já se sabe há muito tempo que essa célula desempenha um importante papel em respostas

alérgicas e na defesa contra helmintos, porém sua interação com outros patógenos continua a ser investigada (RAVIN; LOY, 2016).

Reconhecido por ser o leucócito menos comum circulando no sangue, o basófilo possui granulações similares aos mastócitos, com vários grânulos de coloração basofílica preenchendo seu citoplasma. Liberam vários mediadores inflamatórios, como a histamina e o leucotrieno C4 além de ser uma fonte significativa de citocinas vitais para a patogênese da doença alérgica, como interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13) (SCHROEDER, 2009).

E por último, para dar destaque às células de análise do trabalho, os linfócitos, que apesar de quase uniformes na aparência são variados em função, classificados como T, B e células NK. São responsáveis pela produção de anticorpos, por eliminar células infectadas com vírus e células tumorais, além de, claro, possuir grande responsabilidade na regulação da resposta imune (LAROSA; ORANGE, 2008).

1.6 SARS-Cov-2 e Marcadores Inflamatórios Inespecíficos

A COVID-19 (*Corona Vírus Disease -19*) é uma doença causada pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) que foi identificado pela primeira vez em Wuhan, China, em dezembro de 2019 (ACAR; DEMIR, *et al.*, 2021). Desde março de 2020, a doença se espalhou rapidamente e se tornou uma pandemia. No Brasil, mais de 30 milhões de casos confirmados foram registrados, tornando o país um dos epicentros da doença na América do Sul. A infecção é caracterizada por fortes reações inflamatórias e de coagulação sanguínea, com a tempestade de citocinas sendo um importante marcador de prognóstico nos pacientes, juntamente com outros marcadores inflamatórios e comorbidades (ALAGBE; PEDROSO, *et al.*, 2022).

Nas infecções pelo SARS-CoV-2, há uma desregulação da resposta imune, resultando em hiperinflamação. Isso é causado pela capacidade do vírus de inibir a sinalização do interferon e depleção das células T, além de promover a produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). O objetivo da resposta imune do hospedeiro é limitar a replicação e disseminação viral, mas se essa resposta for excessiva, o paciente pode desenvolver sintomas graves (RAHMAN; ABDULATEEF, *et al.*, 2021).

Muitos estudos relatam que uma resposta inflamatória anormal em pacientes com COVID-19 é um fator preditivo significativo de mortalidade. Em casos graves da doença, esses

estudos indicam que a contagem geral de leucócitos e a concentração de proteína C reativa (PCR) aumenta, enquanto a contagem de linfócitos diminui (ACAR; DEMIR, *et al.*, 2021).

A PCR é uma proteína inflamatória de fase aguda e aumenta cerca de 1000x nos sítios de inflamação e infecção (SPROSTON; ASHWORTH, 2018). Ela faz parte da maquinaria de defesa inata do hospedeiro humano, sendo uma proteína evolutivamente conservada que acompanha o desenvolvimento dos seres vivos desde os artrópodes. A PCR humana é um pentâmero formado por cinco subunidades idênticas que se liga à fosfocolina (PCh) de maneira dependente do íon cálcio (Ca^{2+}) (PATHAK; AGRAWAL, 2019).

Acredita-se que a principal função fisiológica da PCR seja a eliminação de metais pesados e outras substâncias tóxicas, seguida por uma resposta aguda de defesa do hospedeiro contra infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas. No entanto, nem sempre a ação da PCR é benéfica para a resposta imune, como por exemplo, em situações onde há o surgimento de antígenos incomuns, como autoantígenos, a elevação da PCR no estado inflamatório pode ter papel ativo no desenvolvimento da aterosclerose. Pensando por este lado das consequências dos níveis elevados desta proteína reagindo a presença de antígenos estranhos, como no caso com o SARS-CoV-2, a PCR pode induzir uma resposta autoimune descontrolada, o que sugere que essa proteína não deve ser considerada sempre benéfica, tendo diversas vezes um impacto negativo em algumas situações (TORZEWSKI, 2022).

Durante a pandemia de COVID-19, foi observado que altos níveis de PCR no plasma estão associados a um prognóstico desfavorável na infecção por SARS-CoV-2 (TORZEWSKI; ZIMMERMANN, *et al.*, 2021). Há estudos de caso onde a técnica de aférese de PCR foi utilizada com sucesso para remover seletivamente essa proteína do plasma sanguíneo de dois pacientes infectados com COVID-19, impedindo que o caso se agravasse, e os autores atribuíram essa melhora a remoção da PCR (RINGEL; RAMLOW, *et al.*, 2021) e (TORZEWSKI; ZIMMERMANN, *et al.*, 2021).

Em alguns estudos, foi mencionado também o aumento dos valores de ferritina sérica (CHEN; ZHOU, *et al.*, 2020). A Ferritina sérica é um importante marcador inflamatório (KELL; PRETORIUS, 2014). Diversos mecanismos podem elevar essa proteína na COVID-19, um deles atribui valores elevados de ferritina a lesão hepática por afinidade do vírus com o fígado em estágio avançado da doença (PEREIRA; BARROS, *et al.*, 2020), pois como Brito & Braga, *et al.*, (2020) mostram em sua revisão de literatura, em média 43% dos pacientes com COVID-19 internados evoluem com alteração hepática.

A tempestade de citocinas promovida pela COVID-19 libera IL-6 a qual estimula o aumento de ferritina e a síntese de hepcidina (EDEAS; SALEH, *et al.*, 2020). A hepcidina se liga à ferroportina nos enterócitos e macrófagos, que é o único poro por onde sai o ferro dessas células. Uma vez formado, esse complexo hepcidina-ferroportina é internalizado e posteriormente degradado nos lisossomas, alterando a regulação da absorção de ferro no duodeno e sua liberação das células de estoque, respectivamente (ANTUNES; CANZIANI, 2016). Esse mesmo tipo de mecanismo ocorre em anemias da inflamação ou anemia de doença crônica, que normalmente exibe uma anemia normocrômica e normocítica moderada, acompanhada por redução do ferro sérico e saturação da proteína de transporte de ferro, a transferrina, porém, com elevados níveis de ferritina como resultado do aumento da retenção de ferro nas células de depósito (LANSER; PLAICKNER, *et al.*, 2023).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Atualmente há estudos que mostram os marcadores de inflamação como um sinal de alerta precoce de infecção grave por COVID-19 (ACAR *et al.*, 2021). Infelizmente, poucos centros que atendem pacientes infectados com COVID-19 têm acesso a métodos sofisticados utilizados na determinação dos níveis de citocinas e outros marcadores de inflamação sistêmica e, na maioria das vezes, os métodos para determinação dessas citocinas são demorados e caros (ALAGBE *et al.*, 2022).

Em trabalho anterior do grupo (MATOS, 2022), verificou-se que não houve diferenças quantitativas dos LGG nos pacientes internados na unidade de tratamento intensivo (UTI) do Hospital Municipal Souza Aguiar entre 31 indivíduos infectados e 31 não infectados com SARS-CoV-2. Porém foi observado uma correlação direta e significativa entre os sobreviventes com os LGG e a PCR (dados ainda não publicados).

Desse modo, esse estudo pretende contribuir com dados de outra instituição, verificando se esta correlação se mantém nos pacientes sobreviventes do Hospital Universitário Antônio Pedro e se também está presente a associação com a ferritina.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem por objetivo observar a relação entre o número de linfócitos grandes granulares e as dosagens de marcadores inflamatórios inespecíficos nos pacientes COVID-19 positivos e negativos no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

3.2 Objetivos Específicos

1. Verificar se há associação do LGG com dados do hemograma;
2. Avaliar se há correlação do LGG com os marcadores inflamatórios inespecíficos PCR e ferritina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior que visa analisar sob o aspecto hematológico os biomarcadores laboratoriais da COVID-19, intitulado “ASPECTOS HEMATOLÓGICOS DOS MARCADORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS NO AGRAVAMENTO NA INFECÇÃO POR SARS-COV 2” também chamado pelo acrônimo de “Hematomarcadores na COVID-19”, aprovado sob o CAAE: 34636620.0.0000.5626 em 26/08/2020 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde de Nova Friburgo da Universidade Federal Fluminense.

4.2 Coleta de Dados

Este é um estudo retrospectivo, observacional, transversal, onde um total de 42 amostras de conveniência obtidas durante o período inicial de pandemia foram incluídas, sendo a maioria no momento anterior à vacina (que teve seu início no Brasil em 17/01/2021), visto que somente 4 pacientes eram do ano de 2021. São desde o primeiro semestre de 2020 ao primeiro semestre de 2021, resultando em um ano. Foram selecionadas pessoas que foram internadas apresentando

um perfil de sugestivo de COVID-19 seja por estarem internadas em CTI, ou apresentarem linfopenia e que tivessem realizado hemograma, dosagem de proteína-C reativa e ferritina.

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes que não realizaram o exame da reação em cadeia da polimerase para detecção da COVID-19 ou que realizaram o hemograma, dosagem de PCR e ferritina em um intervalo de tempo maior do que 7 dias antes ou depois do teste molecular para detecção da COVID-19

4.4 Levantamento de dados

Os dados obtidos dos 42 pacientes deste estudo, foram:

- i. Nome, os quais foram associados a um número de registro;
- ii. Idade;
- iii. Sexo;
- iv. Data da coleta, obtidos pelos registros eletrônicos do laboratório;
- v. Motivo/causa da internação, obtido através do prontuário dos pacientes;
- vi. Sobrevivência a internação, obtida tanto por registros eletrônicos do laboratório quanto pelo prontuário do paciente.

4.5 Amostras

O procedimento de coleta sanguínea foi realizado por meio de seringa descartável e transferido para tubos de coleta, divididos de acordo com o tipo de exame ao qual seria submetido, sendo o tubo coletor de soro, com tampa vermelha/amarela, para análises de proteína-C reativa e ferritina. E o tubo com anticoagulante de Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), de tampa roxa, para a realização do hemograma. Ambos os tubos foram identificados com nome, número de prontuário, número da amostra e pedido médico.

4.6 Dosagem da proteína C reativa (PCR)

Pela proteína C reativa ser dosada no soro, as amostras foram centrifugadas para separação do mesmo, e assim, permitir a dosagem. A determinação deste analito foi realizada pelo analisador bioquímico automático ALINITY ci-séries (Abott Diagnostics Division, Longford, Ireland)

4.6.1 Princípio do Teste: Imunoturbidimétrico com Látex:

Partículas de látex cobertas com anticorpos anti-PCR se aglutinam com a proteína-C reativa presente na amostra, com isso é gerado uma turbidez. Essa turbidez é proporcional à concentração da proteína-C reativa na amostra, a qual é verificada por espectrofotometria.

4.7 Dosagem de Ferritina

Assim como no analito anterior por ser dosada no soro, as amostras foram centrifugadas para separação do mesmo, e assim, permitir a dosagem. A determinação deste analito foi realizada pelo mesmo analisador bioquímico automático ALINITY ci-séries (Abott Diagnostics Division, Longford, Ireland).

4.7.1 Princípio do Teste: Imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA):

Um imunoensaio de dois passos é realizado onde a amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos anti-ferritina são combinadas e incubadas. A ferritina presente na amostra liga-se às micropartículas revestidas de anticorpos anti-ferritina. A mistura é lavada. O conjugado de anticorpos anti-ferritina marcado com acridínio é adicionado para criar uma mistura de reação e incubado. Após um ciclo de lavagem, as soluções pré-ativadora e ativadora são adicionadas.

A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas. Há uma relação direta entre a quantidade de ferritina na amostra e as unidades de luz relativas detectadas pela ótica do sistema.

4.8 Hemograma

As extensões sanguíneas foram confeccionadas em lâminas novas, as quais foram devidamente identificadas e coradas pelo corante May-Grünwald Giemsa, para posteriormente serem avaliadas através de microscopia ótica.

As contagens automatizadas do hemograma foram realizadas em equipamento Beckman Coulter LH750.

4.9 Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas foi realizada no microscópio óptico, com o método em ameia (CELKAN, 2020) para evitar que a mesa área seja contada mais de uma vez, onde foram identificados os LGG em 20 linfócitos.

Inicialmente os linfócitos foram verificados no aumento de 400x, para sua classificação e quantificação como linfócitos grandes granulares ou não, em seguida foram analisados de acordo com suas características morfológicas no maior aumento, de 1000x com óleo de imersão.

4.10 Análise Estatística

Os dados obtidos foram registrados em uma planilha Excel, e posteriormente transferidos para análise estatística pelo programa SPSS (Statistical Package for the Social Science) for Windows, versão 24 e Graph Pad Prism. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificar se a distribuição dos parâmetros era normal ou anormal. Em seguida foram realizados os testes T de student, U de Mann-Whitney e correlação de ρ de Spearman com os valores dos índices do Hemograma, LGG, PCR ferritina e idade, conforme positividade para COVID-19, sobrevivência aquela internação e sexo. Foram considerados significativos valores com $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Foram selecionadas 42 amostras de conveniência dos pacientes do Hospital Universitário Antônio Pedro, das quais foi possível recuperar a lâmina do hemograma durante o ano de 2020. Foram excluídas 16 amostras de acordo com os critérios de exclusão.

Atendiam aos critérios lâminas de 26 pacientes. Muitos pacientes apresentavam mais de uma comorbidade onde 11 eram portadores de doença cardiovascular, 14 da oncologia, 4 da Hematologia, 2 pacientes com doença renal crônica, 1 com epilepsia e 1 com síndrome de Papash. Dos 26 pacientes, 17 (65%) eram do sexo masculino e 9 (35%) eram do sexo feminino. Do grupo COVID-19 positivo, 10 (71%) eram do sexo masculino enquanto 4 (29%) eram do sexo feminino, totalizando 14 (100%) pacientes, conforme Tabela 1. No grupo COVID-19 negativo, de um total de 12 (100%) pacientes, 7 (58%) eram masculinos e 5 (42%) eram femininos, conforme Tabela 2.

A mediana da idade da população total de pacientes foi de 61 anos, com idade mínima de 28 e máxima de 89 anos. Não houve diferença estatística entre as idades dos pacientes sobreviventes e não sobreviventes nos grupos conforme positividade para COVID-19. A distribuição dessas idades entre os sexos nestes dois grupos pode ser visualizada nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Dados gerais dos pacientes com COVID-19

| | Geral | Óbitos | Sobreviventes | Valor de p |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------------|-------------------|
| Total de Pacientes | 14 | 6 | 8 | - |
| Sexo | | | | |
| Feminino | 4 | 2 | 2 | - |
| Masculino | 10 | 4 | 6 | - |
| Idade mediana (mín e máx) | | | | |
| Geral | 62,5 (30 e 77) | 62,5 (52 e 75) | 64 (30 e 77) | 0,509 |
| Feminino | 55,5 (30 e 62) | 57 (52 e 62) | 44,5 (30 e 59) | 0,501 |
| Masculino | 69,5 (30 e 77) | 68 (60 e 75) | 69,5 (30 e 77) | 0,639 |

*(p≤0,05) *T-test*.

Tabela 2 - Dados gerais dos pacientes sem COVID-19

| | Geral | Óbitos | Sobreviventes | Valor de p |
|---------------------------------|--------------|-----------------|---------------|------------|
| Total de Pacientes | 12 | 5 | 7 | - |
| Sexo | | | | |
| Feminino | 5 | 1 | 4 | - |
| Masculino | 7 | 4 | 3 | - |
| Idade mediana (mín, máx) | | | | |
| Geral | 59,5 (28,89) | 67 (42,88) | 47 (28,89) | 0,307 |
| Feminino | 59 (28,89) | 60 ^a | 52 (28,89) | - |
| Masculino | 67 (42,88) | 72,5 (42,88) | 47 (44,72) | 0,346 |

* ($p \leq 0,05$) *T-test*.

^aGrupo que possui apenas 1 paciente, portanto não há como realizar cálculos estatísticos

Os pacientes com COVID-19 apresentam uma maior dosagem de PCR quando comparados com o grupo negativo para COVID-19 (Figura 2). A mediana para as dosagens de ferritina entre os grupos não apresentou diferença estatística (Figura 3).

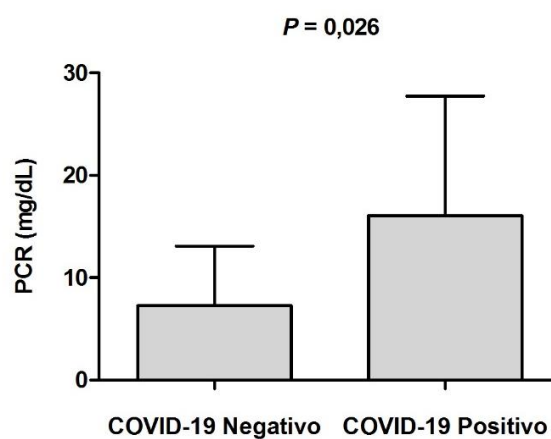


Figura 2. Dosagem de PCR entre os grupos conforme positividade para COVID-19.

Fonte: Própria.

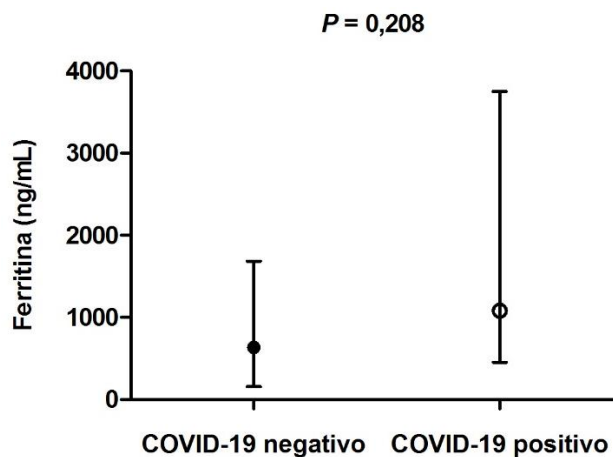


Figura 3. Dosagem de ferritina entre os grupos conforme positividade para COVID-19.
Fonte: Própria.

Os números de LGG não apresentaram diferença entre os grupos com e sem COVID-19 (Figura 4). Conforme esperado, os pacientes positivos para COVID-19 apresentaram menores números de linfócitos se comparado à população negativa. As características laboratoriais restantes não demonstraram diferenças conforme a positividade para COVID-19 como exposto na Tabela 3.

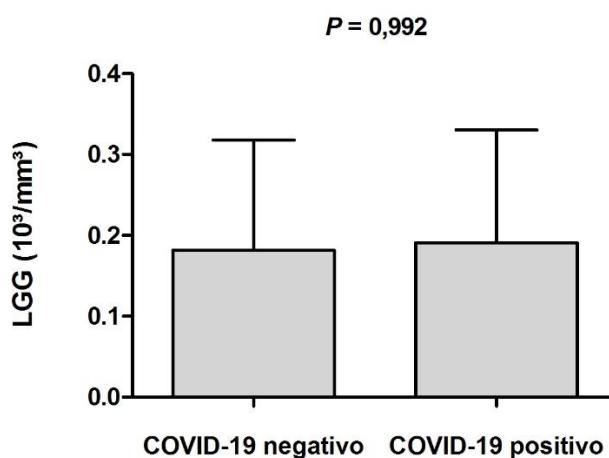


Figura 4. Quantidade de LGG entre os grupos conforme positividade para COVID-19.
Fonte: Própria.

Tabela 3 - Características laboratoriais da população estudada conforme positividade para COVID-19 em pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro

| COVID-19 | | | |
|---|------------------------|-------------------------|-------------------|
| Dado | Não M±DP (n) | Sim M±DP (n) | Valor de P |
| Hb (g/dL)^b | 9,2±2,4 (11) | 9,6±1,8 (14) | 0,566 |
| VCM (fL)^b | 88,8±5,9 (11) | 88,1±6,5 (14) | 0,775 |
| RDW (%)^b | 16,9±3,0 (11) | 16,4±2,7 (14) | 0,677 |
| PLT (x10³/ mm³)^b | 328±263 (11) | 272±175 (14) | 0,529 |
| Leu (x10³/ mm³)^b | 9,3±6,2 (11) | 8,3±5,7 (14) | 0,706 |
| PCR (mg/dL)^b | 7,2±5,9 (12) | 15,9±11,5 (14) | 0,027* |
| Fer (ng/mL)^a | 635,5 [46 e 7591] (12) | 1083 [131 e 20110] (14) | 0,207 |
| Neu (x10³/ mm³)^a | 7,0 [1,4 e 22,7] (11) | 6,22 [0,3 e 18,6] (14) | 0,891 |
| Li (x10³/ mm³)^b | 1,0±0,4 (11) | 0,9±0,5 (14) | p≤0,001** |
| Mono (x10³/ mm³)^a | 0,5 [0,2 e 1,2] (11) | 0,8 [0,1 e 1,9] (14) | 0,297 |
| Eos (x10³/ mm³)^a | 0 [0 e 0,4] (11) | 0,05 [0 e 1] (14) | 0,835 |
| LGG (x10³/ mm³)^b | 0,181±0,136 (11) | 0,190±0,139 (14) | 0,871 |

^a Valores que não apresentam distribuição normal e estão representados por: Mediana [mínimo e máximo] (n). Nesses valores foi realizado Teste U de Mann Whitney. ^b Valores que apresentam distribuição normal e estão representados por: Média±Desvio Padrão (n). Nesses valores foi realizado Teste T de Student. Foram considerados significativos e indicados com * para p≤0,05 e ** para p≤0,001. M: Média; DP: Desvio padrão; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; RDW: Amplitude de distribuição das células vermelhas; PLT: Plaquetas; Leu: Leucócitos; PCR: Proteína C Reativa; Fer: Ferritina; Neu: Neutrófilos; Li: Linfócitos; Mono: Monócitos; Eos: Eosinófilos; LGG: Linfócitos grandes granulares.

Nenhuma diferença foi encontrada quando comparamos os mesmos parâmetros entre os grupos sobreviventes e não sobreviventes (Tabela 4).

Tabela 4 - Características laboratoriais da população estudada conforme a sua sobrevivência em pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro

| Sobreviventes | | | |
|---|------------------------|------------------------|-------------------|
| Dado | Não M±DP (n) | Sim M±DP (n) | Valor de p |
| Hb (g/dL)^b | 9,3±2,6 (10) | 9,5±1,7 (15) | 0,801 |
| VCM (fL)^b | 89,6±7,0 (10) | 87,7±5,6 (15) | 0,456 |
| RDW (%)^b | 17,8±3,2 (10) | 15,9±2,3 (15) | 0,083 |
| PLT (x10³/ mm³)^b | 236±153 (10) | 336±244 (15) | 0,261 |
| Leu (x10³/ mm³)^a | 10,5 [2,7 e 21,7] (10) | 8,2 [1 e 23,7] (15) | 0,183 |
| PCR (mg/dL)^a | 6,6 [1,9 e 25,8] (11) | 11,8 [0,1 e 37,6] (15) | 0,436 |
| Fer (ng/mL)^a | 744 [99 e 7591] (11) | 876 [46 e 20110] (15) | 0,678 |
| Neu (x10³/ mm³)^a | 7,4 [2 e 18,6] (10) | 5,7 [0,3 e 22,7] (15) | 0,318 |
| Li (x10³/ mm³)^b | 1,0±0,6 (10) | 1,0±0,7 (14) | 0,934 |
| Mono (x10³/ mm³)^b | 0,76±0,57 (10) | 0,45±0,29 (15) | 0,094 |
| Eos (x10³/ mm³)^a | 0,05 [0 e 0,2] (10) | 0 [0 e 1] (15) | 0,651 |
| LGG (x10³/ mm³)^b | 0,216±0,140 (10) | 0,168±0,132 (15) | 0,395 |

^a Valores que não apresentam distribuição normal e estão representados por: Mediana [mínimo e máximo] (n). Nesses valores foi realizado Teste U de Mann Whitney. ^b Valores que apresentam distribuição normal e estão representados por: Média±Desvio Padrão (n). Nesses valores foi realizado Teste T de Student. Foram considerados significativos e indicados com * para $p \leq 0,05$ e ** para $p \leq 0,001$. M: Média; DP: Desvio padrão; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; RDW: Amplitude de distribuição das células vermelhas; PLT: Plaquetas; Leu: Leucócitos; PCR: Proteína C Reativa; Fer: Ferritina; Neu: Neutrófilos; Li: Linfócitos; Mono: Monócitos; Eos: Eosinófilos; LGG: Linfócitos grandes granulares.

Foi realizado teste não paramétrico de Mann-Whitney das medianas nesses valores dos índices de hemograma, LGG, PCR, ferritina e idade nos grupos com e sem COVID-19 e em relação à sobrevivência. Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas nos pacientes com e sem COVID-19. Entretanto, quando avaliamos as medianas entre as categorias de sexo encontramos significância com o número de eosinófilos absolutos. Com o sexo masculino apresentando 0,1 de mediana para número de eosinófilos ($x10^3/\mu\text{L}$) e o sexo feminino com 0. O valor encontrado no teste U de Mann-Whitney foi de 27,5 e apresentou valor de P igual a 0,006.

Também foram realizados testes não paramétricos de correlação ρ de Spearman com esses dados. Os valores de p na análise da correlação de LGG com PCR e com a ferritina nos

pacientes sobreviventes foram 0,752 e 0,879 respectivamente, portanto, não apresentaram significância estatística. O mesmo aconteceu com os pacientes não sobreviventes, com valores de p de 0,651 e 0,627 para correlação de LGG com PCR e ferritina respectivamente. A correlação positiva entre PCR e ferritina nos pacientes sobreviventes apresentou p valor de 0,062. Curiosamente, essa mesma proximidade de correlação não foi observada no grupo de pacientes que não sobreviveram, que apresentaram o valor p de 0,485.

Tabela 5 – Correlação entre LGG, hemograma, e marcadores inflamatórios no grupo de pacientes não sobreviventes

| Não Sobreviventes | | | | | |
|--|--------------------|---------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| Parâmetros | Mediana (n) | Mínima | Máxima | Correlação com LGG | Valor de p |
| Hb (g/dL) | 8,85 (10) | 6,1 | 14,8 | 0,261 | 0,467 |
| VCM (fL) | 89,1 (10) | 80 | 102,7 | -0,231 | 0,521 |
| RDW (%) | 17,25 (10) | 13,4 | 22,7 | 0,345 | 0,328 |
| PLT (x10³/mm³) | 204 (10) | 44 | 593 | -0,127 | 0,726 |
| Leu (x10³/mm³) | 10,45 (10) | 2,7 | 21,7 | 0,152 | 0,676 |
| PCR (mg/dL) | 6,57 (10) | 1,93 | 25,8 | 0,164 | 0,651 |
| Fer (ng/mL) | 744 (10) | 99 | 7591 | 0,176 | 0,627 |
| Neu (x10³/mm³) | 7,41 (10) | 2 | 18,6 | -0,055 | 0,881 |
| Li (x10³/mm³) | 0,89 (10) | 0,15 | 1,9 | 0,863 | 0,001** |
| Mono (x10³/mm³) | 0,7 (10) | 0 | 1,9 | 0,685 | 0,029* |
| Eos (x10³/mm³) | 0,05 (10) | 0 | 0,22 | 0,663 | 0,037* |

*($p \leq 0,05$) e **($p \leq 0,01$) Correlação ρ de Spearman; Hb: Hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; RDW: Amplitude de distribuição das células vermelhas; PLT: Plaquetas; Leu: Leucócitos; PCR: Proteína C Reativa; Fer: Ferritina; Neu: Neutrófilos; Li: Linfócitos; Mono: Monócitos; Eos: Eosinófilos; LGG: Linfócitos grandes granulares.

Nos pacientes não sobreviventes, encontramos correlação significativa entre LGG com o valor absoluto de eosinófilos. Além disso, também foi observado correlação de LGG com monócitos nesse mesmo grupo não sobrevivente, conforme exposto na Tabela 5.

6 DISCUSSÃO

A pandemia da COVID-19 surpreendeu a população mundial que precisou desenvolver em tempo recorde testes diagnósticos, estabelecer protocolos de proteção à população em geral, trabalhadores da saúde, formas de diagnóstico, monitoramento e terapêutica (BRITO; BRAGA, *et al.*, 2020). E isso foi perceptível durante a realização do levantamento de dados, onde foi observada relevante dificuldade em obter a dosagem de ferritina nos pacientes em intervalo de tempo menor que uma semana do dia que o paciente testou positivo para COVID-19, o que acabou por excluir muitos pacientes do estudo. Principalmente no grupo de pacientes COVID-19 negativos, pois naquele momento inicial da pandemia os pacientes internados com esse perfil de COVID-19 com linfopenia eram majoritariamente positivos. Isso se torna uma limitação bem estabelecida no presente estudo, além de ser uma população restrita ao Hospital Universitário Antônio Pedro, portanto já em tratamento de outras doenças pré-existentes.

Durante a leitura das extensões, muitas alterações em neutrófilos foram observadas como intensa granulação tóxica, vacuolização, corroborando com os achados bem descritos na literatura (FRATER; ZINI, *et al.*, 2020), como o objetivo era a quantificação de linfócitos, não foram registrados. Também não foram observados eritroblastos durante a microscopia, embora anisocitose e policromasia estivessem presentes em quase todas as lâminas.

Esperava-se obter correlação do número de LGG com PCR nos pacientes sobreviventes, uma vez que no estudo prévio do grupo com 62 pacientes do Hospital Municipal Souza Aguiar essa correlação foi encontrada (MATOS, 2022). No entanto, no presente estudo, essa correlação não foi observada. Atribuímos a possível causa ao fato de nossa população ser representada principalmente por pessoas em tratamento, que mesmo em período de extremo isolamento tiveram de sair de suas casas ou já se encontravam hospitalizados.

No grupo de pacientes não sobreviventes, o número absoluto de LGG correlacionou-se com os números de monócitos e eosinófilos, mas não obteve significância para correlação com a PCR nem com a ferritina. O que pensamos ser atribuível a uma possível interação com as morbidades ou tratamentos e medicações vigentes no momento da infecção, as quais podem acabar alterando o curso da infecção por SARS-CoV-2, já que existem estudos na literatura que demonstram exemplos disso, como no estudo de Vaduganathan & Vardeny *et al.*, 2020, é demonstrado que pacientes que tomam anti-hipertensivos como inibidores do sistema renina-

angiotensina-aldosterona que modulam a enzima conversora de angiotensina do tipo 2, que é um receptor de entrada do SARS-CoV-2 na célula, acabam alterando o andamento da infecção.

Michel & Hentges, *et al.* (2013) resumiu alguns dados sobre interações moleculares que regulam a ativação dependente de monócitos/macrófagos das células NK onde o diálogo entre monócitos ou macrófagos e células NK via contato celular aumenta a atividade das células NK e diferentes tipos de receptores presentes na superfície celular das células NK respondem aos macrófagos estimulados, dependendo do tipo de patógeno. Ela também cita o trabalho de Vankayalapati & Garg, *et al.* (2005) dando exemplo de que macrófagos alveolares infectados, nesse caso, por *M. tuberculosis* são lisados por células NK via interação entre receptores NKG2D e a proteína ligante ULBP1.

Segundo dos-Santos & Salina, *et al.*, (2021), a presença de vírus viáveis de SARS-CoV-2 nos corpos celulares das células fagocitadas pelos macrófagos desregula as respostas anti-inflamatórias dos macrófagos referente a eferocitose de células apoptóticas, além de aumentar sua secreção de citocinas pró inflamatórias resultando em um acúmulo de células nos tecidos, estimulando constantemente o sistema imune, gerando hiperinflamação, exacerbando a lesão tecidual e promovendo o agravamento da doença, o que poderia justificar essa correlação dos números absolutos de monócitos com os LGG nos pacientes não sobreviventes do presente estudo.

Quanto a correlação do LGG com os valores de eosinófilos absolutos, esta será discutida posteriormente.

Conforme já dito, o valor encontrado da correlação de PCR com ferritina nos pacientes que sobreviveram à internação indica tendência, porém acreditamos que o número amostral reduzido limitou a força estatística.

Embora seja bem estabelecido na literatura que tanto a proteína C reativa quanto a ferritina são bons marcadores inflamatórios inespecíficos para predição de mortalidade na COVID-19 (PARIMOO; BISWAS, *et al.*, 2021), alguns lugares não possuíam uma frequência de solicitações estabelecidas de ferritina, como no Hospital Central da Aeronáutica, e como foi o caso local do estudo anterior, o Hospital Municipal Souza Aguiar não realizava, pelo menos localmente, a dosagem deste analito.

Como os estudos anteriores do grupo com estas instituições co-participantes não possuíam dados suficientes para análise da ferritina, o presente trabalho surgiu com a intenção de verificar como a população do Hospital Universitário Antônio Pedro se comportava com os valores de LGG e PCR, acrescentando a Ferritina.

Não foi encontrada significância na correlação dos LGG com a ferritina. Entretanto, especula-se que este resultado seja por conta da falta de sensibilidade do estudo devido ao pequeno número de pacientes analisados, pois já se sabe que a concentração sérica de ferro pode modular a atividade citotóxica das células NK (NISHIYA; HORWITZ, 1982) e (JIANG; ELLIOTT, 2017).

Recentemente Sottile & Federico, *et al.*, (2019) demonstrou a possibilidade, no caso de doenças infecciosas, da ferritina induzir as células NK, por modulação de moléculas MHC de classe I, a produzirem citocinas pró-inflamatórias que possam contribuir para impulsionar a imunidade adaptativa em direção a uma resposta imune Th2. As principais citocinas secretadas pelos linfócitos Th2 são IL-4, IL-5 e IL-13 (BERNER; AKÇA, *et al.*, 2000). Curiosamente, o receptor heterodimérico de IL-5 é conhecido por ser o receptor de citocina mais importante expressado pelos eosinófilos e contribui para o desenvolvimento de eosinófilos maduros para a circulação (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017), o que sugere coerência nessa correlação dos números absolutos de LGG com os de eosinófilos encontrada no presente estudo.

Voltando ao raciocínio, vimos acima que há a possibilidade da ferritina induzir atividade das células NK, e já é sabido que hiperferritinemia é indicador de mau prognóstico na COVID-19. Como demonstrado por Kurian & Mathews, *et al.*, (2023), pacientes moderados a graves internados com COVID-19 na Índia apresentaram níveis elevados de ferritina. Os que apresentaram valor de ferritina superior a 287,4 tiveram maiores chances de desenvolver infecções moderadas a graves por COVID-19.

Devido a completa dependência do ferro exógeno para sobrevivência da maioria dos micro-organismos, acredita-se que esta elevação da ferritina seja um mecanismo de defesa promovido pelo processo inflamatório para realizar uma retenção do ferro, reduzindo sua biodisponibilidade e privando o patógeno deste. Entretanto, este mecanismo acaba agindo como uma faca de dois gumes, pois também contribui para má oxigenação tecidual do próprio hospedeiro (SAMPAIO; SACRAMENTO, *et al.*, 2022).

Apesar da disponibilidade e acessibilidade dos testes de ferritina, essa por muitas vezes acaba sendo uma ferramenta negligenciada para prever o prognóstico da COVID-19, com a maioria dos médicos focando principalmente na IL 6, proteína-C reativa e dímero d como marcador de infecção grave por COVID-19. Além disso, em sistemas de atenção básica, muitas vezes devido há falta de recursos, onde investigações mais elaboradas como dosagens de citocinas e outros marcadores não são possíveis, um teste de ferritina sérica poderia ajudar a entender a gravidade da doença (HULKOTI; ACHARYA, *et al.*, 2022). Embora, um provável

motivo para a ausência do pedido de dosagem da ferritina nas requisições médicas seja devido a sua metodologia, que por utilizar marcadores imunológicos e não bioquímicos, acaba se tornando um pouco mais caro, mas ainda assim, como discutido no presente estudo, sua dosagem possui relevante importância para a avaliação prognóstica do paciente com COVID-19.

7 CONCLUSÃO

Nos grupos estudados não encontramos correlações significativas entre as LGG com marcadores inflamatórios inespecíficos nem com os dados do hemograma.

O número de LGG da população COVID-19 positiva e negativa foi similar.

Observou-se correlação de Spearman positiva significativa de LGG com Eosinófilos e Monócitos entre os pacientes não sobreviventes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, A. M.; YANG, C.; THAKAR, M. S., *et al.* "Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization", **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1869, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869. .
- ACAR, E.; DEMIR, A.; YILDIRIM, B., *et al.* "The role of hemogram parameters and C-reactive protein in predicting mortality in COVID-19 infection", **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 7, p. e14256, jul. 2021. DOI: 10.1111/ijcp.14256. .
- ALAGBE, A. E.; PEDROSO, G. A.; DE OLIVEIRA, B. B., *et al.* "Hemograms and serial hemogram-derived ratios in survivors and non-survivors of COVID-19 in Campinas, Brazil", **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 28 nov. 2022. DOI: 10.1016/j.htct.2022.11.003. .
- ANTUNES, Isa Matos Ferreira. Título: ESTUDO COMPARATIVO DA PRESENÇA DE LINFÓCITOS GRANDES GRANULARES ENTRE GRUPOS COVID E NÃO COVID INTERNADOS EM CTI DO HOSPITAL MUNICIPAL SOUZA AGUIAR. Niterói, 2022, 43 páginas. Biomedicina – Universidade Federal Fluminense.
- ANTUNES, S. A.; CANZIANI, M. E. F. "Hepcidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease", **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 38, p. 351–355, set. 2016. DOI: 10.5935/0101-2800.20160053. .
- BERNER, B.; AKÇA, D.; JUNG, T., *et al.* "Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry", **The Journal of rheumatology**, v. 27, n. 5, p. 1128–1135, 1 maio 2000.
- BRITO, S. B. P.; BRAGA, I. O.; CUNHA, C. C., *et al.* "Pandemia da COVID-19: o maior desafio do século XXI", **Vigil Sanit Debate, Rio de Janeiro**, v. 8, n. 2, p. 54–63, 28 abr. 2020. DOI: 10.22239/2317-269X.01531. .
- BURN, G. L.; FOTI, A.; MARSMAN, G., *et al.* "The Neutrophil", **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1377–1391, 13 jul. 2021. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.06.006. .
- CALIGIURI, M. A. "Human natural killer cells", **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461–469, 1 ago. 2008. DOI: 10.1182/blood-2007-09-077438. .
- CARRICK, J. B.; BEGG, A. P. "Peripheral blood leukocytes", **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 239–259, v, ago. 2008. DOI: 10.1016/j.cveq.2008.05.003. .
- CELKAN, T. T. "What does a hemogram say to us?", **Turk Pediatri Arsivi**, v. 55, n. 2, p. 103–116, 2020. DOI: 10.14744/TurkPediatriArs.2019.76301. .
- CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X., *et al.* "Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study", **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 fev. 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7. .

DE LA TORRE, E.; GENARO, A. M.; RIBEIRO, M. L., *et al.* "Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice", **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 2, p. 82–89, 1 fev. 2008. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.11.005. .

DOS-SANTOS, D.; SALINA, A; C. G., RODRIGUES, T. S., *et al.* **Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory programming and continual clearance of apoptotic cells.** . [S.l.], medRxiv. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.18.21251504v1>. Acesso em: 25 jun. 2023. , 23 fev. 2021

EBERL, G. "Immunity by equilibrium", **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 8, p. 524–532, ago. 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.75. .

EDEAS, M.; SALEH, J.; PEYSSONNAUX, C. "Iron: Innocent bystander or vicious culprit in COVID-19 pathogenesis?", **International Journal of Infectious Diseases**, v. 97, p. 303–305, 1 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.05.110. .

ELOMAA, O.; SANKALA, M.; PIKKARAINEN, T., *et al.* "Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region *", **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 8, p. 4530–4538, 20 fev. 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.8.4530. .

FRATER, J. L.; ZINI, G.; D'ONOFRIO, G., *et al.* "COVID-19 and the clinical hematology laboratory", **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 42 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 11–18, jun. 2020. DOI: 10.1111/ijlh.13229. .

HULKOTI, V. S.; ACHARYA, S.; KUMAR, S., *et al.* "Association of serum ferritin with COVID-19 in a cross-sectional study of 200 intensive care unit patients in a rural hospital: Is ferritin the forgotten biomarker of mortality in severe COVID-19?", **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 5, p. 2045–2050, maio 2022. DOI: 10.4103/jfmpc.jfmpc_1921_21. .

JIANG, X.-P.; ELLIOTT, R. L. "Decreased Iron in Cancer Cells and Their Microenvironment Improves Cytolysis of Breast Cancer Cells by Natural Killer Cells", **Anticancer Research**, v. 37, n. 5, p. 2297–2305, 1 maio 2017. .

KELL, D. B.; PRETORIUS, E. "Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells", **Metallomics: Integrated Biometal Science**, v. 6, n. 4, p. 748–773, abr. 2014. DOI: 10.1039/c3mt00347g. .

KURIAN, S. J.; MATHEWS, S. P.; PAUL, A., *et al.* "Association of serum ferritin with severity and clinical outcome in COVID-19 patients: An observational study in a tertiary healthcare facility", **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 21, p. 101295, 2023. DOI: 10.1016/j.cegh.2023.101295. .

LANSER, L.; PLAIKNER, M.; SCHROLL, A., *et al.* "Tissue iron distribution in patients with anemia of inflammation: Results of a pilot study", **American Journal of Hematology**, v. 98, n. 6, p. 890–899, jun. 2023. DOI: 10.1002/ajh.26909. .

LAROSA, D. F.; ORANGE, J. S. "1. Lymphocytes", **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 2 Suppl, p. S364-369; quiz S412, fev. 2008. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.06.016. .

MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. "The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma", **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 93, 2017. DOI: 10.3389/fmed.2017.00093. .

MICHEL, T.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. "Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells", **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2013. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2012.00403>. Acesso em: 24 jun. 2023.

NISHIYA, K.; HORWITZ, D. A. "Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity", **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 129, n. 6, p. 2519–2523, dez. 1982. .

PARIMOO, A.; BISWAS, A.; BAITHA, U., *et al.* "Dynamics of Inflammatory Markers in Predicting Mortality in COVID-19", **Cureus**, v. 13, n. 10, p. e19080, out. 2021. DOI: 10.7759/cureus.19080. .

PARKIN, J.; COHEN, B. "An overview of the immune system", **Lancet (London, England)**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2 jun. 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04904-7. .

PATHAK, A.; AGRAWAL, A. "Evolution of C-Reactive Protein", **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 943, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00943. .

PEREIRA, M. A. M.; BARROS, I. C. de A.; JACOB, A. L. V., *et al.* "Laboratory findings in SARS-CoV-2 infections: State of the art", **Revista Da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 66, n. 8, p. 1152–1156, ago. 2020. DOI: 10.1590/1806-9282.66.8.1152. .

RAHMAN, H. S.; ABDULATEEF, D. S.; HUSSEN, N. H., *et al.* "Recent Advancements on COVID-19: A Comprehensive Review", **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 10351–10372, 2021. DOI: 10.2147/IJGM.S339475. .

RAVIN, K. A.; LOY, M. "The Eosinophil in Infection", **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 50, n. 2, p. 214–227, abr. 2016. DOI: 10.1007/s12016-015-8525-4. .

RIBATTI, D. "Historical overview on the morphological characterization of large granular lymphocytes/natural killer cells", **Immunology letters**, v. 190, out. 2017. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.07.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28757130/>. Acesso em: 7 abr. 2023.

RINGEL, J.; RAMLOW, A.; BOCK, C., *et al.* "Case Report: C-Reactive Protein Apheresis in a Patient With COVID-19 and Fulminant CRP Increase", **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 708101, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.708101. .

SAMPAIO, S. C.; SACRAMENTO, G. S.; ALMEIDA, J. B. de. "The role of iron and ferritin in pathophysiology and as a laboratory marker in COVID-19", **Revista Ciências em Saúde**, v. 12, n. 3, p. 12–21, 29 ago. 2022. DOI: 10.21876/rchsci.v12i3.1275. .

SCHROEDER, J. T. "Basophils beyond effector cells of allergic inflammation", **Advances in Immunology**, v. 101, p. 123–161, 2009. DOI: 10.1016/S0065-2776(08)01004-3. .

SOTTILE, R.; FEDERICO, G.; GAROFALO, C., *et al.* "Iron and Ferritin Modulate MHC Class I Expression and NK Cell Recognition", **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 224, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00224. .

SPROSTON, N. R.; ASHWORTH, J. J. "Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection", **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 754, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00754. .

TERRA, B.; MAIA, A. M. "Leucemia de grandes linfócitos granulares", **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 141–148, 2010. DOI: 10.1590/S1516-84842010005000034. .

TORZEWSKI, J.; ZIMMERMANN, O.; KAYSER, S., *et al.* "Successful Treatment of a 39-Year-Old COVID-19 Patient with Respiratory Failure by Selective C-Reactive Protein Apheresis", **The American Journal of Case Reports**, v. 22, p. e932964, 5 ago. 2021. DOI: 10.12659/AJCR.932964. .

TORZEWSKI, M. "C-Reactive Protein: Friend or Foe? Phylogeny From Heavy Metals to Modified Lipoproteins and SARS-CoV-2", **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, p. 797116, 2022. DOI: 10.3389/fcvm.2022.797116. .

VADUGANATHAN, M.; VARDENY, O.; MICHEL, T., *et al.* "Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19", **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. 1653–1659, 23 abr. 2020. DOI: 10.1056/NEJMsr2005760. .

VANKAYALAPATI, R.; GARG, A.; PORGADOR, A., *et al.* "Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium", **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 175, n. 7, p. 4611–4617, 1 out. 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.7.4611. .

YATIM, K; M., LAKKIS, F. G. "A brief journey through the immune system", **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 10, n. 7, p. 1274–1281, 7 jul. 2015. DOI: 10.2215/CJN.10031014. .