

Universidade Federal Do Triângulo Mineiro
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde

Anna Glória Fonseca Teodoro

Resposta Inflamatória e Ativação da Coagulação na Infecção por COVID-19

Uberaba
2023

Anna Glória Fonseca Teodoro

Resposta Inflamatória e Ativação da Coagulação na Infecção por COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Medicina translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva

Uberaba
2023

T289r Teodoro, Anna Glória Fonseca
Resposta inflamatória e ativação da coagulação na infecção
por COVID-19 / Anna Glória Fonseca Teodoro. -- 2023.
39 p.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universi-
dade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues

Júnior

1. COVID-19. 2. Trombose. 3. Inflamação. I. Silva, Marcos
Vinicius da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

Anna Glória Fonseca Teodoro

Resposta Inflamatória e Ativação da Coagulação na Infecção por COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração: Medicina translacional, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

14 de março de 2023.

Banca examinadora:

Dr. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dra. Thais Soares Farnesi De Assunção
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dr. Helioswilton Sales de Campos
Universidade Federal de Goiás - UFG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder realizar esse sonho e por me fortalecer nos momentos de fraqueza e dificuldades. Ao meu pai Diorivano, minha mãe Vânia e meu esposo Wanderson, que me apoiaram durante minha trajetória. De forma incondicional, à minha Cecília, que esteve comigo em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Marcos, meu orientador, pela paciência e pelos ensinamentos que muito contribuíram para a conclusão desse projeto.

Aos profissionais de saúde que lutaram e ainda lutam contra a COVID-19.

RESUMO

A infecção causada pelo SARSCoV-2 é responsável por desencadear a COVID-19, uma doença complexa com apresentações clínicas heterogêneas, podendo manifestar-se de forma grave, frequentemente apresentando hipercoagulação, resultando em lesões no endotélio vascular e aumentando consideravelmente o risco de complicações trombóticas. A coagulopatia subsequente exacerba significativamente o prognóstico dos pacientes, contribuindo para um aumento na taxa de mortalidade global. Este estudo de coorte envolveu 97 pacientes hospitalizados na macrorregião do Triângulo Mineiro. Foram realizadas revisões de prontuários médicos para avaliar os aspectos clínicos e laboratoriais, a frequência de trombose, bem como a medição de citocinas nos grupos que apresentaram ou não um evento trombótico. Observou-se que 77,3% dos pacientes hospitalizados com a doença necessitaram de suporte de oxigênio, sendo que 53,61% apresentaram quadro clínico grave. A taxa de eventos trombóticos confirmados foi de 7,2%. Alterações nos fatores de coagulação foram encontradas em 27,84%, incluindo plaquetopenia. No grupo que apresentou eventos trombóticos, os níveis de interleucinas IL-1b, IL-10 e IL-2 foram mais elevados do que na ausência de evento trombótico ($p < 0,05$). Encontrou-se uma associação positiva entre o aumento da IL-10 e a chance da ocorrência de um evento trombótico. Conclui-se que há um aumento na resposta inflamatória em pacientes com eventos trombóticos, evidenciando a inter-relação entre o sistema imunológico e distúrbios na coagulação. Além disso, alterações nos fatores de coagulação, como a redução na contagem de plaquetas, foram frequentes em pacientes com COVID-19 hospitalizados.

Palavras-chaves: COVID-19, SARSCoV-2, coagulação, trombose, citocinas, resposta imune.

ABSTRACT

The infection caused by SARSCoV-2 is responsible for triggering COVID-19, a complex disease with heterogeneous clinical presentations that can manifest severely, often exhibiting hypercoagulation, resulting in vascular endothelial injuries and significantly increasing the risk of thrombotic complications. Subsequent coagulopathy significantly worsens the prognosis of patients, contributing to an overall increase in the mortality rate. This cohort study involved 97 hospitalized patients in the Triângulo Mineiro macroregion. Medical record reviews were conducted to assess clinical and laboratory aspects, the frequency of thrombosis, and the measurement of cytokines in groups that did or did not experience a thrombotic event. It was observed that 77.3% of hospitalized patients with the disease required oxygen support, with 53.61% presenting a severe clinical picture. The confirmed thrombotic event rate was 7.2%. Alterations in coagulation factors were found in 27.84%, including thrombocytopenia. In the group that experienced thrombotic events, levels of interleukins IL-1b, IL-10, and IL-2 were higher than in the absence of thrombotic events ($p < 0.05$). A positive association was found between increased IL-10 levels and the likelihood of a thrombotic event. It is concluded that there is an increase in the inflammatory response in patients with thrombotic events, highlighting the interrelation between the immune system and coagulation disorders. Additionally, alterations in coagulation factors, such as a reduction in platelet count, were frequent in hospitalized COVID-19 patients.

Keywords: COVID-19, SARSCoV-2, coagulation, thrombosis, cytokines, immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig1. Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2.	17
Fig2: Presença de múltiplos trombos com oclusão vascular subtotal de artérias e veias pulmonares	19
Fig 3: A imunopatologia do COVID-19.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados relacionados ao sexo, idade e tempo de internação para pacientes hospitalizados com suspeita clínica de COVID-19.....	30
Tabela 2- Taxa de testes laboratoriais positivos e taxa de exames tomográficos com aspecto característico para COVID-19.....	31
Tabela 3- Avaliação das frequências para a classificação da gravidade, suporte de oxigênio, método para o suporte de oxigênio em pacientes hospitalizados em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.	31
Tabela 4- Descrição das frequências para os eventos trombóticos, uso de anticoagulante, plaquetose, plaquetopenia e a classificação da plaquetopenia em pacientes hospitalizados com a COVID-19.	33
Tabela 5- Análise dos exames laboratoriais TAP e TTPA em pacientes hospitalizados com COVID-19	34
Tabela 6- Descrição e comparação de parâmetros clínicos laboratoriais entre pacientes com suspeita clínica para COVID-19, confirmados ou não para evento trombótico, avaliados em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.	35
Tabela 7- Avaliação das citocinas na relação com eventos trombóticos para pacientes com suspeita para COVID-19 em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil. ...	36
Tabela 8- Efeito de associação das interleucinas 1 β , 2 e 10 em eventos trombóticos para pacientes hospitalizados com sintomas clínicos para COVID-19 em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2

C = correlação

CEP - Comitê de Ética em pesquisa

COVID-19: Doença do coronavírus 2019

CoVs: Coronavírus

DP = desvio padrão

E: Proteína de envelope

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

g: grandeza de aceleração da centrífuga

IFN: interferon

IFN- α : Interferon AlfaRP

IL – 10: Interleucina-10

IL – 17 : Interleucina-17

IL – 6 : Interleucina-6

M: Proteína da membrana

Md = mediana

MERS: Síndrome respiratória do Oriente Médio

mL: mililitro

N = número

N: Proteína do nucleocapsídeo

NETs - armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF κ B: Fator nuclear kappa B

ng: Nanogramas

NK: natural kille

nm: Nanômetros

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAMP: Padrões moleculares associados ao patógeno

PBMCs: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: tampão fosfato-salino

PF: Peptídeo de fusão

PRR: Receptores de reconhecimento de padrões

RBD: Receptor Binding Domain

S: Proteína Spike

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SFB: soro fetal bovino

TAP - tempo de atividade da protrombina

TNF α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF: fator de necrose tumoral

TTPa - tempo de tromboplastina parcial ativada

U = teste de Mann-Whitney

UTI - unidade de terapia intensiva

\bar{X} = média

X² = qui-quadrado

μg : Microgramas

% = percentual

* = diferenças estatisticamente significativas

\bar{x} =: média

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 O Agente Etiológico: SARS-CoV-2.....	15
Fig1. Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2.....	17
2.2 A Doença COVID-19: Transmissão, Diagnóstico, Manifestações clínicas laboratoriais e Complicações	17
2.2 Resposta Imunológica na COVID-19.....	21
2.3 Coagulopatia no COVID-19.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. METODOLOGIA	27
4.2 - ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E HISTÓRIA CLÍNICA DOS PACIENTES	27
4.3 - DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS	28
4.4 - ANÁLISE DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS	28
5.5 - ANÁLISES ES-TATÍSTICAS.....	28
5.6 - ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTOS.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 ANÁLISE DA POPULAÇÃO	30
5.2- ANÁLISE DE EVENTOS TROMBÓTICOS E EXAMES LABORATORIAIS RELACIONADOS	32
5.3- ANÁLISE DA LINHAGEM HEMATOPOIÉTICA E EXAMES LABORATORIAIS EM RELAÇÃO A OCORRÊNCIA DE EVENTO TROMBÓTICO.....	35
5.3- ANÁLISE DAS INTERLEUCINAS NA EVIDÊNCIA DE EVENTOS TROMBÓTICOS	36
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÕES.....	41

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No final de 2019 e início de 2020, primeiro, a China e depois o resto do mundo foi confrontado com a eclosão de uma nova doença, uma infecção viral por um vírus denominado corona vírus SARS-CoV-2 que causa uma grave Síndrome Respiratória Aguda (GUBERNATOROVA et al., 2020). O SARSCoV-2 é responsável pela pandemia da doença por coronavírus (COVID-19). A COVID-19 é uma doença complexa com um amplo espectro de apresentações clínicas, variando de assintomáticos a insuficiência respiratória grave com falência de múltiplos órgãos e morte (BARRETT et al., 2021).

A maioria dos pacientes com COVID-19 é assintomáticos ou tem doença respiratória leve. No entanto, há casos fatais com manifestações multiorgânicas e sistêmicas como sepse, choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos. Os pacientes podem apresentar quadros clínicos com: inflamação pulmonar grave, síndrome do desconforto respiratório agudo, lesão cardíaca, lesão renal, eventos trombóticos, especialmente em pacientes com idade avançada e comorbidades (diabetes mellitus, hiper-tensão e insuficiência cardíaca)(HAN et al., 2020).

Estudos tem apontado que o SARS-CoV-2 é citopático e isso pode causar o primeiro dano aos pulmões, conforme evidenciado em exames patológicos. Todavia, não se tem clareza quanto ao que justificaria a amplitude de sintomas e a diferença na gravidade da doença de um indivíduo para outro (HAN et al., 2020) .

Outro achado comum em pacientes com COVID-19 é a presença de lesão endotelial grave com ruptura da membrana celular endotelial e a presença de micro trombos nos capilares alveolares (ACKERMANN et al., 2020). Essas observações apontam claramente para a identificação de uma coagulopatia associada ao COVID-19, que pode contribuir para trombose, danos em vários órgãos e à gravidade e a mortalidade.

Tem sido observado que na COVID-19 o sistema imunológico é ativado e a amplitude dessa ativação é variável entre os indivíduos. Acredita-se que a ativação exacerbada de citocinas, denominada “tempestade de citocinas”, tenha um papel importante na patogênese de casos graves de COVID-19. A tempestade de citocinas pode ser desencadeada por várias doenças infecciosas ou não infecciosas, e causar graves danos a múltiplos órgãos (HAN et al., 2020).

Ressalta-se que os casos mais graves de infecção pelo SARS-CoV-2 apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. A maioria dos casos severos de COVID-19 com síndrome de angústia respiratória foram associados com altos níveis sistêmicos de IL-1 β , TNF- α e IL-6, sugerindo uma conexão entre a indução de citocinas e os danos pulmonares na COVID-19 (GUBERNATOROVA et al., 2020).

Sabe-se que as interleucinas IL-1 β ; IL-6 e IL-8 estão envolvidas na maioria das doenças crônicas e doenças inflamatórias agudas. As infecções agudas podem alterar a hemodinâmica e os sistemas de coagulação e fibrinolítico de forma a precipitar eventos isquêmicos, com tromboembolismo relacionado com processos inflamatórios e níveis elevados de IL-8, por exemplo, via complexo trombina-antitrombina (BESTER; MATSHAILWE; PRETORIUS, 2018). A interleucina IL-6 é responsável por um dos principais mecanismos pelos quais a inflamação ativa a coagulação induzindo a expressão do fator tecidual. Além disso, sabe-se que as concentrações séricas de IL-1 β estão aumentadas em pacientes com doença cardíaca isquêmica (BESTER; MATSHAILWE; PRETORIUS, 2018).

Como um biomarcador de inflamação, o fibrinogênio, que é também um fator de coagulação, indica a presença de inflamação e identifica indivíduos com alto risco para doenças cardiovasculares quando elevado. O Fibrinogênio e os produtos de degradação da fibrina estimulam as expressões de mRNA e proteínas de IL-6, TNF- α , demonstrando uma correlação estreita entre sistema imune e sistema de coagulação na patogênese de diversas doenças (LU et al., 2011). A produção de fibrinogênio é regulado positivamente em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação, infecção, neoplasia ou dano ao tecido (FIBRINOGEN STUDIES COLLABORATION, 2005). Os produtos de degradação da fibrina, por exemplo o Dímero-D, são utilizados frequentemente como marcadores de eventos trombóticos. A coagulopatia na infecção pelo COVID-19 é semelhante a coagulopatia induzida pela sepsis, caracterizando-se por coagulopatia intravascular disseminada (CIVD) e micro-angiopatia trombótica (LLITJOS et al., 2020).

Altos níveis de expressão de IL-1 β e IFN- γ foram detectados em pacientes com COVID-19. Essas citocinas inflamatórias podem ativar a resposta das células T auxiliares tipo 1 (Th1). No entanto, diferentemente dos pacientes com SARS, os pacientes com COVID-19 também apresentam níveis elevados de citocinas secretadas por células Th2 (como IL-4 e IL-10), que inibem a resposta inflamatória. Os níveis séricos de IL-2R e IL-6 em pacientes com COVID-19 estão positivamente correlacionados com a gravidade da doença (YE; WANG;

MAO, 2020)

A infecção, pelo SARS-Cov-2, grave é caracterizada por uma resposta inflamatória aguda e são quase invariavelmente acompanhadas por alterações do sistema de coagulação. Em geral, após a lesão por um microrganismo, as células imunes são recrutadas e as citocinas pró-inflamatórias são geradas, essas citocinas são mediadores da ativação de coagulação. A coagulação pode influenciar o perfil de componentes do sangue, como plaquetas, glóbulos vermelhos e redes de fibrina (BESTER; MATSHAILWE; PRETORIUS, 2018).

Dentre as alterações potencialmente relacionadas com pior evolução clínica na COVID-19, destaca-se a predisposição para doença tromboembólica venosa e arterial devido à inflamação excessiva, hipóxia, imobilização e coagulação intravascular difusa (DIC). O conhecimento preciso da incidência de complicações trombóticas em pacientes COVID-19 é importante para a tomada de decisão no que diz respeito a intensidade da trombopprofilaxia, especialmente em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) com maior risco trombótico (LLITJOS et al., 2020).

Alguns estudos evidenciaram a alta incidência de complicações trombóticas em pacientes de UTI com infecções pelo SARS-Cov-2 (KLOK et al., 2020; LLITJOS et al., 2020), suscitando a hipótese de que possa haver uma correlação entre a alta incidência de eventos trombóticos nesses pacientes com a resposta imune exacerbada observada em pacientes críticos com COVID-19.

Além da insuficiência respiratória, a coagulopatia é uma anormalidade comum em pacientes com COVID-19. Um estudo relatou uma taxa de até 27% de tromboembolismo em pacientes COVID-19 (LLITJOS et al., 2020). Outro estudo, evidenciou uma incidência de eventos trombóticos agudos de 5,2% em pacientes hospitalizados com COVID-19 compostos por tromboembolismo venoso (2,7%), acidente vascular cerebral isquêmico agudo (1,2%) e infarto agudo do miocárdio (1,2%). Para pacientes de UTI, eventos trombóticos ocorreram 8,8% (ELBADAWI et al., 2020). Uma meta-análise, compreendendo 28.173 pacientes com COVID-19 (94% hospitalizados), estimou uma prevalência intra-hospitalar de tromboembolismo venoso de 14,1% (NOPP et al., 2020). As diferenças estatísticas se devem ao fato de que os estudos incluem métodos variados de identificação de eventos trombóticos. De uma maneira geral, muitos estudos concluíram que a COVID-19 aumenta a incidência de eventos trombóticos e coagulopatia.

Embora o perfil patológico exaustivo da trombose devido a COVID-19 ainda não tenha sido totalmente esclarecido, um achado significativo que emerge na diferença entre os distúrbios COVID-19 e não COVID-19 é que as alterações da coagulação são mediadas principalmente por a ativação de plaquetas e intrinsecamente relacionada à inflamação endotelial mediada por vírus (ZHANG et al., 2020).

Alguns estudos destacam o papel dos megacariócitos e plaquetas na patogênese da COVID-19. A trombocitopenia é uma anormalidade laboratorial comum em pacientes críticos e está associada a resultados clínicos ruins, incluindo morte. Trombocitopenia foi relatada em pacientes hospitalizados com COVID-19, e contagens de plaquetas mais baixas estão associadas a piores resultados clínicos (BARRETT et al., 2021).

Uma meta-análise de 31 estudos com 7.613 participantes observou uma menor contagem de plaquetas na infecção grave por COVID-19 e foi associada a um aumento de 3 vezes no risco de desenvolver COVID-19 grave (JIANG et al., 2020). Assim, torna-se relevante a análise do perfil plaquetário de pacientes com COVID-19 na nossa população.

Neste contexto, nosso propósito é avaliar, amostras de soro obtidas de pacientes com diferentes formas clínicas, em diferentes momentos da infecção, buscando determinar fatores que contribuem para uma produção exacerbada e desregulada de citocinas e marcadores de alteração no sistema de coagulação correlacionados com maior incidência de eventos trombóticos em pacientes com COVID-19. Nossa abordagem está ancorada em aspectos clínicos e laboratoriais dos participantes, uma vez que contamos com a participação dos principais hospitais e unidades de pronto atendimento envolvidas no combate à COVID-19 na macrorregião do Triângulo Mineiro/MG, permitindo apontar características do sistema imunológico e do sistema de coagulação e sua relação com o desenvolvimento, agravamento e/ou recuperação da COVID-19.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O AGENTE ETIOLÓGICO: SARS-COV-2

No final de dezembro de 2019, várias unidades de saúde em Wuhan, na província de Hubei, na China, relataram aglomerados de pacientes com pneumonia de causa desconhecida. Posteriormente, o agente etiológico dessa infecção foi identificado como SARS-COV-2. O coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) é um coronavírus altamente

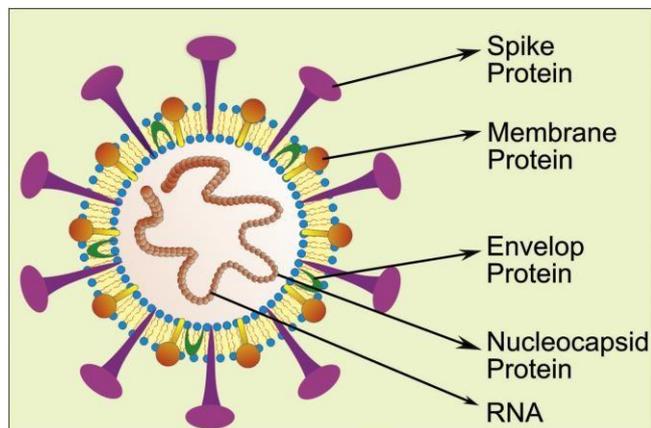
transmissível e patogênico e causa a doença do coronavírus 2019 (COVID-19), que ameaça a saúde do ser humano e a segurança pública (HU et al., 2021).

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de fita simples e fita positiva pertencentes à família Coronaviridae, ordem Nidovirales. Os CoVs são os maiores vírus de RNA conhecidos (YE; WANG; MAO, 2020). A ordem Nidovirales é composta pelas famílias Coronaviridae, Arteriviridae, Mesoviridae e Roniviridae. A família Coronaviridae possui duas subfamílias: Coronavirinae e Torovirinae. A subfamília Coronavirinae consiste em alfa(α) CoV, beta(β) CoV, gama CoV e delta CoV com base na estrutura genômica. No entanto, entre estes, apenas os gêneros de coronavírus alfa (α) e beta (β) são patogênicos para mamíferos e humanos (UMAKANTHAN et al., 2020).

Durante a extensa pesquisa sobre coronavírus, um total de seis coronavírus foram identificados como causador de doenças respiratórias, ou seja, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave) e MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio). Curiosamente, desses HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 foram relatados como menos patogênicos em comparação com SARS-CoV e MERS-CoV (SAMUDRALA et al., 2020).

O SARS-CoV-2 (COVID-19) é um entre muitos outros vírus da espécie, o CoV relacionado ao SARS. A COVID-19 é uma partícula envelopada esférica ou pleomórfica contendo RNA de fita simples associado a uma nucleoproteína dentro de um capsídeo composto de proteína da matriz (MOUSAVIZADEH; GHASEMI, 2021). Sob o microscópio eletrônico, as partículas do vírus exibem uma forma de cristal áspero esférico ou multifacetado. A superfície dos vírus tem projeções proeminentes compostas por sua proteína spike, essa estrutura viral é ilustrada na figura 1 (SAMUDRALA et al., 2020; YE; WANG; MAO, 2020). O SARS-CoV-2 infecta células epiteliais respiratórias humanas por meio de interações entre proteínas S (glicoproteína Spike) no vírus com receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (YANG et al., 2020).

Fig1. Representação esquemática do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Samudrala PK et al, 2020

Os morcegos são importantes hospedeiros naturais de alfacoronavírus e betacoronavírus. O parente mais próximo do SARS-CoV-2 conhecido até o momento é um coronavírus de morcego detectado na província de Yunnan, China, cuja sequênciagenômica completa é 96,2% idêntica à do SARS-CoV-2. Isso, suporta a hipótese de que SARS-CoV-2 provavelmente se originou de morcegos (HU et al., 2021).

Os CoVs podem infectar uma variedade de espécies hospedeiras, incluindo pássaros, humanos e alguns outros vertebrados. Esses vírus causam principalmente infecções respiratórias e intestinais e induzem uma variedade de manifestações clínicas (YE; WANG; MAO, 2020)

2.2 A DOENÇA COVID-19: TRANSMISSÃO, DIAGNÓSTICO, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS LABORATORIAIS E COMPLICAÇÕES

A transmissão do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-COV-2) ocorre principalmente por meio de gotículas respiratórias do contato pessoal e, em menor grau, por superfícies contaminadas (WIERSINGA et al., 2020). Os coronavírus podem persistir em superfícies inanimadas por dias, o que também pode ser o caso do SARS-CoV-2 e pode representar um risco prolongado de infecção. Isso explica a rápida disseminação geográfica da COVID-19 (HU et al., 2021).

A transmissão de humano para humano ocorre por meio de vias comuns. Tosse, espirro, inalação de gotículas, contato com as mucosas oral, nasal e ocular são os modos comuns de disseminação. A disseminação viral ocorre a partir do trato respiratório, saliva, fezes e urina, resultando em outras fontes de disseminação do vírus (UMAKANTHAN et al., 2020).

Um número sem precedentes de novos testes de diagnóstico foi desenvolvido para o COVID-19 usando tecnologias de ponta. Três tipos de testes diagnósticos são relevantes para o manejo de pacientes e controle de pandemias: testes de amplificação molecular ou de ácido nucleico (por exemplo, testes de PCR) que detectam RNA viral; testes de antígenos que detectam proteínas virais (por exemplo, nucleocapsídeos ou proteínas de pico); e testes sorológicos que detectam anticorpos do hospedeiro em resposta à infecção, ou vacinação, ou ambos. Os dois primeiros tipos de testes podem ser usados para diagnosticar a infecção aguda. Por outro lado, os testes sorológicos fornecem apenas evidências indiretas de infecção 1 a 2 semanas após o início dos sintomas e são mais bem usados para vigilância. Atualmente, o RT-PCR é o método mais utilizado em todo o mundo para a detecção de SARS-CoV-2 (PEELING et al., 2022).

O diagnóstico de COVID-19 geralmente é feito por teste de reação em cadeia de polimerase de um swab da nasofaringe. No entanto, dada a possibilidade de resultados, falso-negativos, os achados clínicos, laboratoriais e de imagem também podem ser utilizados para o diagnóstico presuntivo de indivíduos com alto índice de suspeita clínica de infecção (WIERSINGA et al., 2020).

As características clínicas variaram de doença leve a doença grave ou fatal. Os sintomas mais comuns da COVID-19 foram inespecíficos e incluíram principalmente: febre, tosse e mialgia. Outros sintomas menores foram dor de garganta, dor de cabeça, calafrios, náuseas ou vômitos, diarreia e congestão conjuntival (UMAKANTHAN et al., 2020). Sintomas comuns em pacientes hospitalizados incluem febre (70%-90%), tosse seca (60%-86%), falta de ar (53%-80%), fadiga (38%), mialgias (15%-44%), náuseas/vômitos ou diarreia (15%-39%), dor de cabeça, fraqueza (25%) e rinorreia (7%). Anosmia ou ageusia pode ser o único sintoma de apresentação em aproximadamente 3% dos indivíduos com COVID-19 (WIERSINGA et al., 2020). Em casos graves, a COVID-19 é caracterizado por explosão e hiper inflamação de citocinas, ativação plaquetária, disfunção endotelial e coagulopatia relacionada à sepse (GUAN et al., 2020).

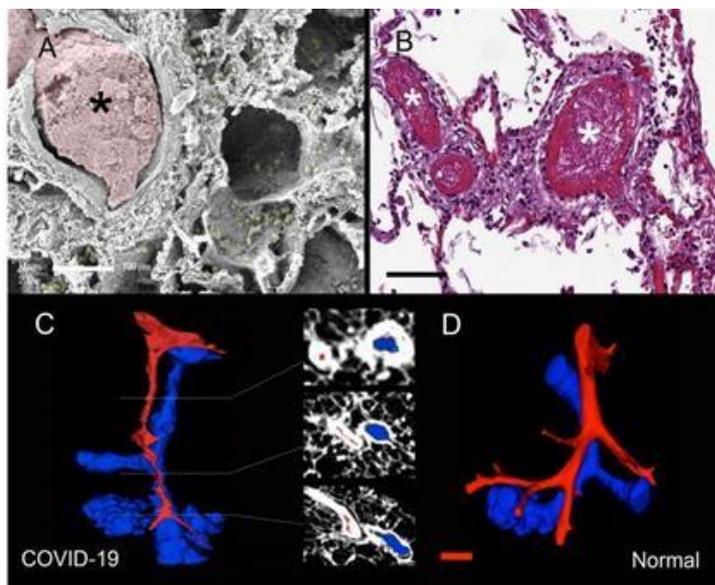
Em geral, homens mais velhos (>60 anos) com comorbidades são mais propensos a desenvolver doença respiratória grave, enquanto a maioria dos jovens e crianças tem apenas doenças leves ou são assintomáticos (HU et al., 2021). Em um relato de 72.314 casos na China, 81% dos casos foram classificados como leves, 14% foram casos graves que necessitaram de ventilação em unidade de terapia intensiva (UTI) e 5% foram críticos (ou seja, os pacientes apresentavam insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção ou falência

de múltiplos órgãos) (HU et al., 2021).

Ao se ligar às células epiteliais no trato respiratório, o SARS-CoV-2 começa a se replicar e migrar para as vias aéreas e entrar nas células epiteliais alveolares nos pulmões. A rápida replicação do SARS-CoV-2 nos pulmões pode desencadear uma forte resposta imune. A tempestade de citocinas causa síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória, que é considerada a principal causa de morte em pacientes com COVID-19 (HUANG et al., 2020).

As alterações histopatológicas em pacientes com COVID-19 ocorrem principalmente nos pulmões. As análises histopatológicas mostraram dano alveolar difuso bilateral, formação de membrana hialina, descamação de pneumócitos e depósitos de fibrina nos pulmões de pacientes com COVID-19 grave. A inflamação exsudativa também foi mostrada em alguns casos (HU et al., 2021). Outras características observadas foram: a lesão endotelial severa associada ao vírus intracelular e ruptura do endotélio; a presença de trombose vascular disseminada com microangiopatia e oclusão dos capilares alveolares; e o aumento da angiogênese intussusceptiva (ACKERMANN et al., 2020). Na figura 2, mostra-se a presença de trombos nas artérias e veias pulmonares de pacientes com COVID-19

Fig2: Presença de múltiplos trombos com oclusão vascular subtotal de artérias e veias pulmonares



Fonte: Ackermann M et al,2020

Nota: (A) microscopia eletrônica de varredura; (B) microscopia convencional Histopatologia e (C, D): reconstrução 3D baseada em microCT de artérias pulmonares subsegmentais (vermelho) e vias aéreas (azul) demonstraram oclusão (sub) total em pulmões com COVID-19.

Anormalidades laboratoriais comuns entre pacientes hospitalizados incluem linfopenia, marcadores inflamatórios elevados (por exemplo, velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa, ferritina, fator de necrose tumoral- α , IL-1, IL-6) e parâmetros anormais de coagulação (por exemplo, tempo de protrombina prolongado, trombocitopenia, dímero D elevado, fibrinogênio baixo) (WIERSINGA et al., 2020).

Uma revisão sistemática de 19 estudos de 2.874 pacientes que eram principalmente da China, relatou a variedade típica de anormalidades laboratoriais observadas no COVID-19, incluindo proteína C reativa sérica elevada, lactato desidrogenase aumentada. Aproximadamente 75% dos pacientes apresentavam albumina baixa (WU; MCGOOGAN, 2020).

A linfopenia é a anormalidade hematológica mais comum e está presente em até 83% dos pacientes hospitalizados com COVID-19. Em conjunto com a coagulopatia, é comum o prolongamento modesto dos tempos de protrombina (prolongado em >5% dos pacientes), trombocitopenia leve (presente em aproximadamente 30% dos pacientes) e valores elevados de dímero D (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020).

A trombocitopenia é uma anormalidade laboratorial também comum em pacientes críticos com COVID-19 e está associada a desfechos clínicos ruins, incluindo óbito. Trombocitopenia foi relatada em pacientes hospitalizados com COVID-19, e contagens mais baixas de plaquetas estão associadas a piores desfechos clínicos (BARRETT et al., 2021).

Os achados radiográficos comuns de indivíduos com COVID-19 incluem infiltrados predominantes no lobo inferior bilaterais na imagem radiográfica de tórax e opacidades em vidro fosco bilaterais, periféricas e no lobo inferior e/ou consolidação na tomografia computadorizada de tórax (WIERSINGA et al., 2020). Na admissão, a opacidade em vidro fosco foi o achado radiológico mais comum na tomografia computadorizada (TC) de tórax (HU et al., 2021; HUANG et al., 2020).

Complicações comuns entre pacientes hospitalizados com COVID-19 incluem pneumonia; síndrome do desconforto respiratório agudo; lesão hepática aguda, caracterizada por elevações na aspartato transaminase, alanina transaminase e bilirrubina; lesão cardíaca, incluindo elevação da troponina, insuficiência cardíaca aguda, arritmias e miocardite; coagulopatia pro-trombótica resultando em eventos tromboembólicos venosos e arteriais; lesão renal aguda; manifestações neurológicas, incluindo consciência prejudicada e doença

cerebrovascular aguda; e choque (WIERSINGA et al., 2020).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA COVID-19

As infecções por patógenos são reconhecidas pelo sistema imunológico, que consiste em dois tipos de respostas: uma resposta imune inata que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e uma resposta imune adaptativa específica de antígeno. Em ambas as respostas, existem várias células ativadas do sistema imunológico, que desempenham um papel fundamental no estabelecimento do ambiente de citocinas (HAN et al., 2020). Uma resposta imune inata rápida e bem coordenada é a primeira linha de defesa contra a infecção viral. No entanto, respostas imunes desreguladas e excessivas podem causar danos imunológicos ao corpo humano (YE; WANG; MAO, 2020). As citocinas sintetizadas de forma excessiva levam a uma resposta inflamatória sistêmica aguda e grave conhecida como “tempestade de citocinas”. Vários estudos experimentais e ensaios clínicos sugeriram que a tempestade de citocinas se correlacionava diretamente com a lesão tecidual e um prognóstico desfavorável de doenças pulmonares graves (HAN et al., 2020).

As respostas imunes à infecção por SARS-CoV são iniciadas pelo sistema imunológico inato, que reconhece patógenos e induz citocinas pró-inflamatórias para desencadear a resposta imune, e é seguida por respostas do sistema imune adaptativa, consistindo em células T. As citocinas são produzidas durante a resposta imune, o que atrai ainda mais células pró-inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos (YANG et al., 2020a). Eos macrófagos mostraram uma produção significativa de IL-6, sugerindo que podem contribuir para a inflamação excessiva na doença de COVID-19 (PACES et al., 2020).

A resposta do IFN, como um componente crítico da resposta imune inata, é a primeira linha de defesa antiviral do hospedeiro. Em contraste com os primeiros relatos de níveis indetectáveis de IFNs tipo I e III no soro de pacientes com COVID-19, os dados emergentes obtidos daqueles com COVID-19 grave oferecem evidências de respostas robustas de IFN-I após o atraso inicial dos IFNs. A resposta tardia do IFN tipo I pode aumentar a hiperinflamação no estágio final do COVID-19 grave (LEE; SHIN, 2020). A resposta do interferon é retardada no início e obviamente insuficiente para controlar o vírus. Como uma estratégia crítica de escape imunológico, o SARS-CoV-2 usa uma variedade de métodos para antagonizar o sistema IFN com a consequência clínica de uma resposta insuficiente do IFN tipo I, que foi documentada nos primeiros estudos do COVID-19 (LEE; SHIN, 2020)^{27,28}].

Uma interação próxima entre o vírus SARS-CoV-2 e o sistema imunológico de um

indivíduo resulta em uma manifestação clínica diversificada da doença COVID-19. Embora as respostas imunes adaptativas sejam essenciais para a eliminação do vírus SARS-CoV-2, as células imunes inatas, como os macrófagos, podem contribuir, em alguns casos, para a progressão da doença (PACES et al., 2020).

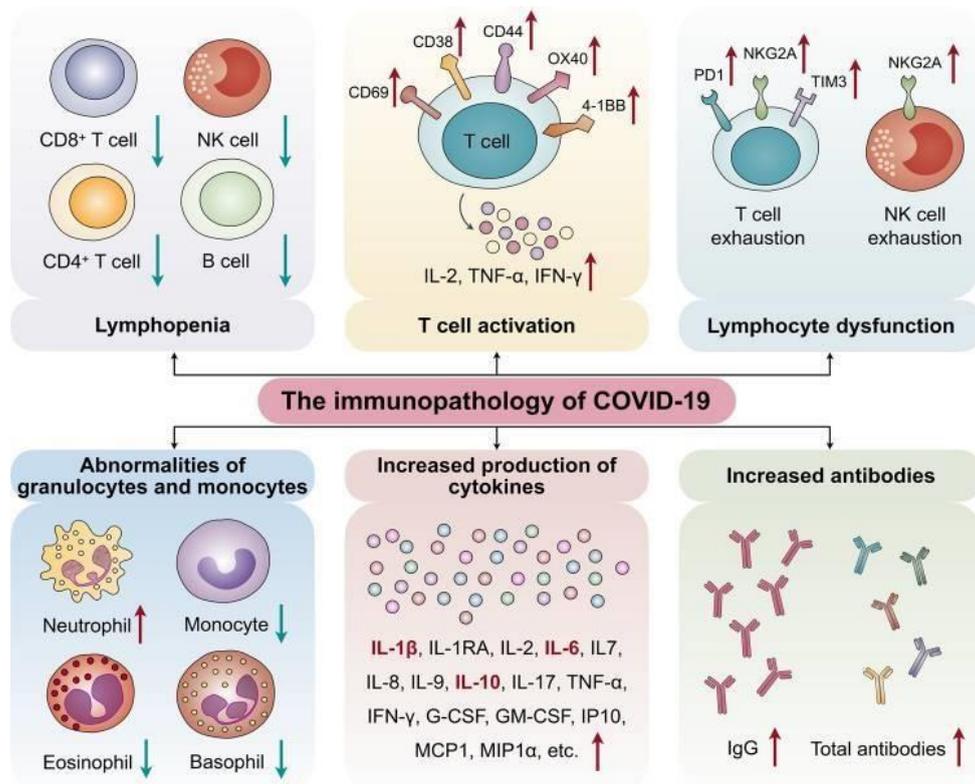
Evidências mostram que os padrões imunológicos estão intimamente associados à progressão da doença de pacientes infectados por COVID-19. O SARS-CoV-2 interrompe as respostas imunes normais, levando a um sistema imunológico comprometido e respostas inflamatórias descontroladas em pacientes graves com COVID-19. Esses pacientes apresentam linfopenia, ativação e disfunção de linfócitos, anormalidades de granulócitos e monócitos, níveis elevados de citocinas (YANG et al., 2020a).

Os pacientes com COVID-19 não só apresentam linfopenia, como também têm número de granulócitos e monócitos anormais. Os neutrófilos e a relação neutrófilos/linfócitos são significativamente maiores em pacientes graves (YANG et al., 2020a).

O papel regulador dos neutrófilos na imunidade do hospedeiro inclui principalmente a fagocitose, a desgranulação e a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Nas últimas décadas, o estudo da inflamação neutrofílica contra patógenos preocupou-se com a produção de NETs. NETs são estruturas grandes, extracelulares, semelhantes a teias, compostas de teias extracelulares de DNA, histonas, proteínas microbidas e enzimas oxidativas (MIKACENIC et al., 2018). Por um lado, as NETs podem neutralizar e matar patógenos; por outro lado, os NETs medeiam a inflamação patológica em tecidos ou órgãos infectados por vírus ou bactérias. Como mencionado, a ativação agressiva de neutrófilos, que leva diretamente a danos teciduais com o procedimento, como explosões oxidativas, fagocitose e geração contínua de NETs de neutrófilos, é conhecida como NETose (MIKACENIC et al., 2018). Durante o estágio inicial da pandemia de COVID-19, foi relatado pela primeira vez que marcadores séricos de NETs estavam elevados no soro de pacientes com COVID-19. Foram encontrados níveis elevados de NETs tanto no aspirado traqueal quanto no plasma em pacientes com COVID-19 grave (MIKACENIC et al., 2018; WANG et al., 2022).

Na figura 3, pode-se observar algumas dessas alterações imunológicas descritas como o aumento do número de neutrófilos, linfopenia e o aumento na produção de determinadas citocinas (YANG et al., 2020a).

Fig 3: A imunopatologia do COVID-19.



Fonte: COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. de Yang L, et al.

O SARS-CoV-2 infecta células epiteliais respiratórias humanas por meio de interações entre proteínas S (glicoproteína Spike) no vírus com receptores da enzimaconvertora de angiotensina 2 (ACE2). Além disso, o vírus pode infectar diretamente células T e macrófagos, que é uma característica fundamental da patogênese mediada por SARS-CoV. Assim, a expressão do receptor ACE2 nos linfócitos, especialmente nas células T, promove a entrada do SARS-CoV-2 nos linfócitos. A diminuição do número de células T está inversamente correlacionada com os níveis de TNF α , IL-6 e IL-10, indicando que um aumento nos níveis de citocinas inflamatórias pode promover a depleção e exaustão das populações de células T concomitante à progressão da doença (YANG et al., 2020a).

Após a infecção com SARS-CoV-2, as células T CD4⁺ podem ser rapidamente ativadas em células T auxiliares patogênicas (Th1) que secretam GM-CSF, o que induz ainda mais monócitos CD14⁺ CD16⁺ com altos níveis de IL-6 e acelera a inflamação. Há um aumento em uma subpopulação de monócitos CD14⁺ IL-1 β ⁺ em pacientes com COVID-19, o que pode promover o aumento da produção de IL-1 β . Entre essas citocinas, a IL-6 é um mediador chave para o desenvolvimento da tempestade de citocinas em casos de COVID-19 (YANG et al., 2020a; YE; WANG; MAO, 2020). A IL-6 modula a defesa do hospedeiro através de uma série

de mecanismos imunoestimulantes: controle de monócitos e sua diferenciação em macrófagos, modulação da diferenciação de células B, aumento da produção de IgG por células B e promoção da resposta Th2 pela inibida polarização Th1. Vários estudos revelaram forte correlação entre os níveis de IL-6 no soro e a insuficiência respiratória na COVID-19 (GUBERNATOROVA et al., 2020).

A linfopenia é onipresente em pacientes com COVID-19, com contagem absoluta significativamente diminuída de células T e níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IFN- γ , IL-6, IL-8 (DONG KIM et al., 2007). Além disso, as células T são críticas para suprimir a resposta imune inata hiperativa durante a infecção viral (WANG et al., 2022). Além disso, foram relatados mais subconjuntos pró-inflamatórios CCR6⁺ Th17 no sangue periférico de casos graves de COVID-19 do que casos leves de COVID-19. Estudos indicaram uma resposta elevada das células Th17 e uma função reduzida das células Treg, consequentemente há uma hiperinflamação e a progressão da doença de COVID-19, particularmente nos casos graves da COVID-19 (WANG et al., 2022).

Os casos mais graves de COVID-19 exibem um aumento extremo nas citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), proteína de inflamação de macrófagos-1 α , IFN- γ e TNF- α , representando a “tempestade de citocinas”. Em particular, IL-1 β , IL-6 e IL-10 são as três citocinas mais elevadas em casos graves (HAN et al., 2020; YANG et al., 2020a)

2.3 COAGULOPATIA NO COVID-19

Há uma quantidade impressionante de evidências emergentes que sugerem a presença de um estado hiper coagulável em pacientes com COVID-19. Isso é particularmente importante devido aos maus resultados clínicos associados a essa complicação em pacientes críticos (KICHLOO et al., 2020).

A infecção por COVID-19 está associada à alta incidência de trombose microe macro vascular (HADID; KAFRI; AL-KATIB, 2021). E os pacientes graves com COVID-19 frequentemente apresentam coagulopatia, além da formação maciça de coágulos intravasculares semelhantes à coagulação intravascular disseminada (IBA et al., 2020). A coagulação intravascular disseminada (CIVD) e trombose macro vascular podem ocorrer em pacientes com

COVID-19, o que leva a morbidade e mortalidade substanciais.

As complicações trombóticas do novo coronavírus (COVID-19) são um aspecto preocupante da doença. A COVID-19 predispõe os pacientes a um estado de hipercoagulabilidade, no entanto, a fisiopatologia por trás das complicações trombóticas observadas nesta doença não é totalmente compreendida. Vários mecanismos foram propostos e a patogênese provavelmente envolve uma resposta imune do hospedeiro que contribui para a lesão das células endoteliais vasculares, inflamação, ativação da cascata de coagulação via expressão do fator tecidual e desligamento da fibrinólise (KICHLOO et al., 2020).

Os mecanismos da coagulopatia induzida por COVID-19 podem se sobrepor em parte aos da coagulopatia séptica induzida por bactérias. O excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias, o aumento dos níveis de padrões moleculares associados ao dano, a estimulação dos mecanismos de morte celular e o dano endotelial vascular são as principais causas do distúrbio de coagulação em qualquer infecção grave (IBA et al., 2020). A tempestade de citocinas induzida pela infecção por COVID-19 parece contribuir para o desenvolvimento de extensas trombozes e falência de órgãos.

As células endoteliais vasculares são críticas para a regulação da permeabilidade vascular, manutenção da hemostasia e regulação da hemólise. Assim, não é surpresa que desempenhem um papel significativo na vasculopatia e trombose do COVID-19. A lesão endotelial vascular parece ser uma observação importante nos pulmões de pacientes com COVID-19 (KICHLOO et al., 2020). Ao comparar amostras de tecido pulmonar de autópsia de pacientes com COVID-19 com pacientes com influenza H1N1 e controles saudáveis, foi observada alteração morfológica significativa das células endoteliais, além da presença de vírus intracelular. Os grupos COVID-19 e influenza demonstraram dano alveolar difuso e infiltração de linfócitos perivasculares, no entanto, os pulmões de COVID-19 revelaram micro trombos nos capilares alveolares numa incidência 9 vezes maior (ACKERMANN et al., 2020; KICHLOO et al., 2020).

A coagulopatia induzida pela COVID-19 é comumente associada a elevação considerável dos produtos de degradação da fibrina, mas com modesta ou nenhuma alteração no tempo de tromboplastina parcial ativada e no tempo de protrombina. Assim, níveis mais altos de dímero D são frequentemente encontrados em pacientes críticos com infecção por coronavírus e se correlacionam inversamente com a sobrevivência (HADID; KAFRI; AL-KATIB, 2021).

Inflamação aumentada, imunidade desregulada e eventos trombóticos são características de pacientes hospitalizados com COVID-19. Dado que as plaquetas são os principais reguladores da trombose, inflamação e imunidade, elas representam um dos principais candidatos como mediadores da patogênese associada a COVID-19. E contagem, tamanho e maturidade de plaquetas estão associados ao aumento de doenças críticas e mortalidade por todas as causas entre pacientes hospitalizados com COVID-19 (BARRETT et al., 2021).

A trombocitopenia é comum em pacientes criticamente enfermos e muitas vezes significa descompensação clínica, disfunção orgânica e progressão para CIVD. Na COVID-19, a contagem de plaquetas geralmente é normal ou levemente reduzida. Apesar de não ser tão comum, a trombocitopenia grave se correlaciona com a progressão da doença (HADID; KAFRI; AL-KATIB, 2021; YANG et al., 2020)

De uma maneira geral, conclui-se que a COVID-19 está associada a um risco aumentado de trombose. Assim, a anti coagulação pode desempenhar um papel fundamental no manejo da COVID-19 e ter um impacto positivo na sobrevivência. Compreender melhor os aspectos envolvidos na coagulopatia promovida pelo coronavírus é importante para otimizar o tratamento e o manejo clínico dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o padrão de citocinas e quimiocinas séricas e correlacionar com alterações no sistema de coagulação e eventos tromboembólicos em pacientes com COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os exames laboratoriais realizados durante internação, principalmente contagem de plaquetas, tempo de atividade da protrombina (TAP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) de pacientes com COVID-19;
- Avaliar os níveis de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-8, IL-1Beta, TNF-alfa e Proteína C Reativa, em paciente com COVID-19 que apresentaram evento trombótico grave e comparar com a dosagem de paciente que não apresentaram trombose evidente;
- Correlacionar estes dados com parâmetros clínicos, laboratoriais nos pacientes com

COVID-19.

4. METODOLOGIA

4.1 - PACIENTES E AMOSTRAS

Participaram deste estudo 97 pacientes com clínica de COVID-19 e que apresentaram algum exame laboratorial ou radiológico sugestivo para a doença. Os testes laboratoriais considerados para o diagnóstico foram teste sorológico para COVID-19 ou RT-PCR, sendo que 79 pacientes apresentaram teste positivo. O exame radiológico utilizado também como critério diagnóstico foi a tomografia de tórax com aspecto de opacidade em vidro fosco. Dos pacientes selecionados, em 88 casos foi identificado o aspecto tomográfico característico. Em 18 casos os testes laboratoriais de diagnóstico foram negativos, todavia apresentaram clínica sugestiva e exame radiológico compatível com a doença COVID-19, e por isso foram incluídos no estudo.

Foram excluídos do estudo pacientes que não concordaram em participar da pesquisa e pacientes com idade menor que 18 anos. Também foram excluídos do estudo, pacientes com suspeita clínica de COVID-19 que apresentaram testes laboratoriais negativos e exame radiológico não compatível com a doença. Além disso, não incluímos na pesquisa pacientes com distúrbios na coagulação previamente conhecidos.

As coletas analisadas foram realizadas no período de abril a agosto de 2020. E considerando que o processo de vacinação contra a COVID-19 se iniciou em janeiro de 2021, todas as amostras estudadas são do período prévio a vacinação.

O recrutamento de participantes deste estudo foi realizado no município de Uberaba-MG, especificamente nos locais estabelecidos para atendimento em regime ambulatorial e hospitalar dos casos de COVID-19 da macrorregião do Triângulo Mineiro. Selecionamos pacientes dos centros de enfrentamento da COVID-19 da nossa macrorregião que nos permitiram acesso a todos os dados clínicos laboratoriais e ao acompanhamento de evolução dos casos que necessitam internação em UTI, com dados diários sobre risco de óbito.

4.2 - ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS E HISTÓRIA CLÍNICA DOS PACIENTES

Realizada revisão sistemática dos prontuários médicos dos 97 pacientes selecionados. Foi feita a análise das repercussões clínicas da doença e investigamos quais pacientes apresentaram eventos tromboticos como trombose venosa profunda, tromboembolia pulmonar, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico e embolia arterial.

Além disso, os pacientes foram classificados de acordo com o quadro clínico apresentado em casos leves, moderados e graves da doença. Consideramos pacientes com quadro grave ou crítico todos aqueles que necessitaram de ventilação mecânica e cuidados intensivos em UTI. Como moderados classificamos todos aqueles que necessitaram de alguma forma que suporte de oxigênio por um período maior que 24 horas

4.3 - DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS

Foram coletadas amostras de sangue periférica de 55 pacientes, em tubo sem anticoagulante e contendo gel separados, de onde foram armazenados os soros. As citocinas, IL-2, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN γ foram dosadas pela técnica de Cytometric Bead Array - CBA (BD BIOSCIENCES, EUA), conforme instruções do fabricante. As amostras foram analisadas em citômetro FACSCalibur (BD BIOSCIENCES) utilizando o programa Cell Quest (BD BIOSCIENCES). As concentrações das citocinas foram calculadas com base em curva padrão composta de amostras com concentrações conhecidas. Após aquisição dos dados das amostras e citocinas recombinantes, foi feita análise no software FCAP Array 2.0 (SoftFlow-EUA).

4.4 - ANÁLISE DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO E EXAMES LABORATORIAIS

Analisamos os dados contidos em exames laboratoriais solicitados de rotina: como hemograma, contagem de plaquetas, tempo de atividade da protrombina (TAP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). Consideramos na avaliação os exames coletados em datas próximas ao desfecho (alta ou óbito). A análise das dosagens de fibrinogênio e Dímero-D não foi possível, pois não eram exames solicitados rotineiramente nos hospitais ou estavam indisponíveis. Outra limitação ao estudo foi não ter exames laboratoriais de todos os pacientes da amostra, visto que a pesquisa foi realizada por meio da revisão dos prontuários. As análises foram realizadas de acordo com os dados disponíveis.

A contagem de plaquetas também foi estratificada e considerada como normal valores de 150.000 a 450.000/ml; trombocitopenia foi considerada quando valores <150.000/ml e plaquetose >450.000. A trombocitopenia foi classificada quanto a gravidade em leve quando valores entre 100.000 a 150.000/ml, moderadas valores entre 50.000 a 100.000/ml e grave valores menores a 50.000/ml (KAPOOR et al., 2021).

5.5 - ANÁLISES ESTADÍSTICAS

Os dados foram tabulados no programa da Microsoft® Excel e analisados pelo IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Após a extração dos dados para a planilha as etapas de verificação e “limpeza” do banco de dados foram consideradas. As variáveis contínuas foram verificadas quanto à distribuição por meio do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade foi avaliada pelo teste de Levene. A correção de Welch foi utilizada para casos de variâncias desiguais. O teste T não pareado foi utilizado para as avaliações com distribuições gaussianas e sem diferenças nas variâncias e o teste de Mann-Whitney para as comparações não paramétricas. O tamanho de efeito foi determinado pelo Cohen’s d para aplicação de teste para-métrico e o coeficiente de correlação ponto biserial para não paramétrico. O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar as possíveis associações entre variáveis categóricas. Um modelo de regressão logística binomial foi utilizado para avaliar a relação entre citocinas e eventos trombótico, o tamanho de efeito foi estimado pela razão de chances com o respectivo intervalo de confiança (95%). Foi considerado um nível de significância de 5% em todas as análises (R Core Team, 2020; Arango, 2001).

5.6 - ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTOS

Este projeto é parte de um conjunto de projetos envolvendo o combate à pandemia da COVID-19 desenvolvidos na Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM. Especificamente, a presente proposta faz parte de um grande projeto intitulado “Avaliação da resposta imune a infecção pelo Covid-19 em pacientes atendidos no município de Uberaba-MG”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa com protocolo de número CAEE 30474020.2.0000.0008. A coleta de amostras de amostras foi iniciada imediatamente após a aprovação pela CONEP, já contando com centenas de participantes, incluídos após aceitarem participar e assinarem o TCLE, com amostras de soro e/ou PBMCs coletadas em diferentes momentos da infecção.

Ainda, esta proposta faz parte do projeto “Prospecção de marcadores moleculares e genéticos de resistência e suscetibilidade à COVID-19: contribuições ao manejo clínico, transmissão vertical, e ao aprimoramento diagnóstico”, aprovado com nota máxima para financiamento pelo edital CAPES nº 09/2020 - PREVENÇÃO E COMBATE A SURTOS, ENDEMIAS, EPIDEMIAS E PANDEMIAS”, contando com recursos de custeio e capital da ordem de R\$343.302,00 e cotas de bolsas nos níveis de doutorado (12) e pós-doutorado (10). Como recursos adicionais, o proponente faz parte da Rede Mineira de pesquisa em doenças infecciosas humanas e animais do estado de Minas Gerais, um projeto de aproximadamente

R\$1,4 milhões, aprovado pela FAPEMIG e obteve financiamento individual no edital de Demanda Universal daFAPEMIG em 2019

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA POPULAÇÃO

De acordo com os critérios de elegibilidade um total de 97 prontuários foram selecionados e avaliados. Todos os casos haviam a relação com a hipótese diagnóstica para COVID-19, por meio dos parâmetros clínicos iniciais e exames confirmatórios. A frequências para o sexo feminino e masculino, bem como possíveis discrepâncias entre o sexo quanto as taxas de idades e o período de internação foram avaliados. Foi observado uma diferença de 15,46% entre a frequência do sexo masculino (57,73%) e o sexo feminino (42,27%), mas essas diferenças não foram significativas ($X^2 = 2,32$; $p = 0,13$). As médias de idade em anos (feminino: $60,70 \pm 18,10$ em masculino: $60,5 \pm 15,30$) e o tempo de internação em dias (feminino: $13,60 \pm 16,80$ em masculino: $10,60 \pm 9,14$) não apresentam diferenças significativas entre os sexos (Tabela 1).

Tabela 1- Dados relacionados ao sexo, idade e tempo de internação para pacientes hospitalizados com sus- peita clínica de COVID-19.

Características gerais					
Medidas	Sexo			X ²	Valor p
	Feminino	Masculino	Total		
N	41	56	97	2,32	0,13
%	42,27	57,73	100,00		
Idade					
	Feminino	Masculino	T-"student"	Cohen-d	Valor p
Md	62,00	60,50		0,02	0,91
Ā	60,70	60,30	0,12		
DP	18,10	15,30			
Tempo de internação					
	Feminino	Masculino	T-"student"	Cohen-d	Valor p
Md	7,00	7,00		0,23	0,26
Ā	13,60	10,60	1,14		
DP	16,80	9,14			

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nota: N = número. % = percentual. Md = mediana. Ā = média. DP = desvio padrão. Fonte: elaboradapela autora

Da amostra, a taxa de testes de diagnóstico (RT-PCR ou Testes sorológicos) para COVID-19 positivos foi de 81,44 %. Ou seja, dos casos hospitalizados com suspeita clínica de infecção viral pelo coronavírus a maioria foi confirmada com os exames laboratoriais. Dos 97 pacientes selecionados, em 88 casos foi identificado o aspecto tomográfico característico da doença estudada, sendo o exame radiológico também utilizado como teste confirmatório para COVID-19.

Tabela 2- Taxa de testes laboratoriais positivos e taxa de exames tomográficos com aspecto característico para COVID-19

Característica	Confirmação para COVID-19 – Testes laboratoriais			
	N	%	X ²	Valor p
Negativo	18	18,56	38,40	<,001
Positivo	79	81,44		
Total	97	100,00		

Característica	Aspecto de vidro fosco pulmonar na tomografia			
	N	%	X ²	Valor p
Negativo	9	9,28	64,30	<,001
Positivo	88	90,72		
Total	97	100,00		

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nota: N= número %= percentual X²= qui-quadrado.

Com relação a apresentação clínica dos 97 pacientes avaliados, observou que 53,6% apresentaram quadro grave, 23,7% quadro moderado e 22,7% quadro leve. Além disso, constatou-se que dos pacientes hospitalizados uma grande parcela necessitou de alguma forma de suporte de oxigênio, sendo 77,3% dos pacientes fizeram uso de oxigênio suplementar por cateter nasal, máscara de oxigênio ou intubação traqueal. Dos pacientes que necessitaram de intubação traqueal 9% evoluíram com melhora clínica e foram extubados (Tabela 3).

Dos pacientes analisados a taxa geral de óbito foi de 38,1% e dentre os 37 casos que evoluíram para óbito 4 casos apresentaram alguma forma de tromboembolismo. Sabemos que o COVID promove danos a múltiplos órgãos e as causas que levam a mortalidade são diversas.

Tabela 3- Avaliação das frequências para a classificação da gravidade, suporte de oxigênio, método para o suporte de oxigênio em pacientes hospitalizados em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.

Característica	Classificação da gravidade			
	N	%	X ²	Valor p
Leve	22	22,68	18,00	<,001
Moderado	23	23,71		
Grave	52	53,61		
Total	97	100,00		

Característica	Suporte de oxigênio			
	N	%	X ²	Valor p
Não	22	22,68	29,00	<,001
Sim	75	77,32		
Total	97	100,00		

Característica	Método para o suporte de oxigênio			
	N	%	X ²	Valor p
IOT	52	53,60	69,90	<,001
Cateter nasal	23	23,71		
Ar ambiente	22	22,68		
Total	97	100,00		

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Nota: N = número. % = percentual. X² = qui-quadrado.

5.2- ANÁLISE DE EVENTOS TROMBÓTICOS E EXAMES LABORATORIAIS RELACIONADOS

Analizamos a ocorrência e o diagnóstico confirmado de eventos trombóticos como trombose venosa profunda, trombo embolia pulmonar, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico e embolia arterial durante a internação.

Consideramos os eventos confirmados todos aqueles que possuíam suspeita clínica embasada associada a um método de diagnóstico por imagem confirmatório ou a confirmação macroscópica da trombose durante procedimento cirúrgico. Os casos de tromboembolismo pulmonar e de acidente vascular cerebral isquêmico foram confirmados por tomografia ou angiotomografia. A trombose venosa periférica foi confirmada por ultrassonografia de membros inferiores. E o caso de embolia arterial foi confirmado macroscopicamente durante procedimento cirúrgico realizado.

A porcentagem de eventos trombóticos confirmados na amostra de pacientes com

suspeita de COVID-19 foi de 7,2% (Tabela 4). Dos eventos trombóticos foram constatados 4 casos de tromboembolismo pulmonar ou trombose venosa profunda; 2 casos de acidente vascular cerebral isquêmico e 1 caso de embolia arterial.

A taxa de utilização de medicações anticoagulantes na amostra foi estudada e constatamos que quase 93% dos pacientes analisados foram medicados com enoxaparina ou heparina durante o período da internação. Assim, evidenciamos uma taxa de incidência de trombose relevante mesmo em uso de medidas para profilaxia desses eventos (Tabela 4).

Em nosso estudo, foram registrados 27 (27,8%) casos de plaquetopenia (< 150.000/ml), sendo que 19 foram considerados como leves, 6 como moderados e 2 como grave. A taxa de plaquetose (> 450.000/ml) também foi avaliada e encontrou-se uma taxa de 5,1% (Tabela 4).

Tabela 4- Descrição das frequências para os eventos trombóticos, uso de anticoagulante, plaquetose, plaquetopenia e a classificação da plaquetopenia em pacientes hospitalizados com a COVID-19.

Característica	Evento trombótico			
	N	%	X ²	Valor p
Não	90	92,78	71,00	<,001
Sim	7	7,22		
Total	97	100,00		
Característica	Em uso de anticoagulante (heparina)			
	N	%	X ²	Valor p
Não	7	7,22	71,00	<,001
Sim	90	92,78		
Total	97	100,00		
Característica	Plaquetose			
	N	%	X ²	Valor p
Não	92	94,85	78,00	<,001
Sim	5	5,15		
Total	97	100,00		
Característica	Plaquetopenia			
	N	%	X ²	Valor p
Não	70	72,16	19,10	<,001
Sim	27	27,84		
Total				
Característica	Classificação da plaquetopenia			

	N	%	X ²	Valor p
Leve	19	70,37	17,60	<,001
Moderado	6	22,22		
Grave	2	7,41		
Total	27			

Fonte: Elaborada pela autora, 2023

Nota: N = número. % = percentual. X² =qui quadrado.

Com relação aos exames laboratoriais relacionados a coagulação, observamos que o tempo de atividade de protrombina (TAP) apresentou uma atividade menor no grupo com evento trombotico. Apesar dessa diferença entre os grupos não ser significativa, a correlação ponto biserial nos mostra que temos uma diferença relevante entre os dois grupos analisados e que se tivéssemos uma amostra maior provavelmente encontraríamos um resultado significativo. O Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) não apresentou diferenças relevantes entre os grupos.

Em ambos os grupos, encontramos exames laboratoriais de TAP e TTPA com alterações em relação a normalidade. Isso provavelmente ocorreu devido à complexidade da doença causada pelo SARS-CoV2 que pode levar a um processo inflamatório e a alterações nos fatores de coagulação independentemente da presença de evento trombotico. Além disso, devemos destacar que os pacientes podem ter apresentado eventos tromboticos menores durante a internação que não foram diagnosticados e confirmados por exames.

Tabela 5- Análise dos exames laboratoriais TAP e TTPA em pacientes hospitalizados com COVID-19

Parâmetro	Trombose	N	X̄	DP	U	Valor p	C. ponto biserial
TAP - atividade (%)	Negativo	47	86,39	17,90	57,00	0,06	0,51
	Positivo	5	76,08	11,55			
TAP - I.N.R	Negativo	47	1,14	0,22	56,50	0,06	0,52
	Positivo	5	1,29	0,14			
TTPA – relação	Negativo	39	1,24	0,31	80,00	0,53	0,18
	Positivo	5	1,30	0,23			
		Relação TTPA (>1,25)		RC	IC (95%)	Valor p	
		Sim - n	Não - n				
Evento trombotico	Sim - n	2	3	0,9	0,14 a 6,01	0,92	
	Não - n	17	23				
		TAP - atividade (<70%)		RC	IC (95%)	Valor p	

		Sim - n	Não - n			
Evento trombótico	Sim - n	1	4	1,71	0,16 a	0,65
	Não - n	6	41			

Fonte:Elaborada pela autora, 2023

5.3- ANÁLISE DA LINHAGEM HEMATOPOIÉTICA E EXAMES LABORATORIAIS EM RELAÇÃO A OCORRÊNCIA DE EVENTO TROMBÓTICO

Na análise do hemograma dos pacientes com COVID-19 hospitalizados, observou-se que nos casos que ocorreu evento trombótico a contagem de hemácias era significativamente mais baixa em comparação ao grupo que não apresentou evento ($p < 0,050$). Os pacientes que apresentaram algum evento trombótico também apresentaram redução na média dos valores da hemoglobina e do hematócrito, porém sem efeito significativo. Ressalta-se também que houve diferenças significativas na contagem de leucócitos, neutrófilos e monócitos que foram mais elevadas no grupo que apresentou evento trombótico ($p < 0,05$). Com relação a outros exames laboratoriais como PCR, Proteínas totais e albumina não houve diferença significativa entre os pacientes com trombose e sem evento.

Tabela 6- Descrição e comparação de parâmetros clínicos laboratoriais entre pacientes com suspeita clínica para COVID-19, confirmados ou não para evento trombótico, avaliados em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.

Parâmetro	Trombose	N	\bar{X}	DP	U	Valor p	C. ponto bisserial
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Negativo	90	3,88	0,94	173,00	0,04*	0,45
	Positivo	7	3,17	3,09			
Hemoglobina (g%)	Negativo	90	11,46	2,91	193,00	0,09	0,39
	Positivo	7	9,66	2,09			
Hematócrito (%)	Negativo	90	34,73	8,40	224,00	0,21	0,29
	Positivo	7	31,11	6,12			
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	Negativo	90	265055,55	104051,32	292,00	0,75	0,07
	Positivo	7	296142,86	166208,13			
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	Negativo	90	11511,74	6567,84	162,00	0,03*	0,49
	Positivo	7	18562,86	9289,58			
Neutrófilos	Negativo	89	8880,53	5586,20	167,00	0,04*	0,46

(/mm ³)	Positivo	7	14704,96	8352,91			
Bastonetes (/mm ³)	Negativo	89	627,02	1051,94	243,00	0,31	0,22
	Positivo	7	665,84	705,51			
Linfócitos (/mm ³)	Negativo	89	1360,80	873,83	231,00	0,26	0,26
	Positivo	7	1597,59	699,12			
Monócitos (/mm ³)	Negativo	89	613,72	389,49	141,00	0,02*	0,55
	Positivo	7	1190,01	699,97			
Basófilos (/mm ³)	Negativo	89	1,69	9,15	301,00	0,64	0,03
	Positivo	7	0,00	0,00			
PCR (mg/L)	Negativo	75	114,33	115,42	157,00	0,55	0,16
	Positivo	5	77,62	80,96			
Proteínas Totais (g/dL)	Negativo	51	5,74	0,87	110,00	0,63	0,14
	Positivo	5	5,60	0,31			
Albumina (g/dL)	Negativo	53	2,97	0,56	114,00	0,26	0,28
	Positivo	6	2,73	0,41			

Fonte: Elaborada pela autora

Nota: N = número. % = percentual. \bar{X} = média. DP = desvio padrão. U = teste de Mann-Whitney. C = correlação.

* = diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

5.3- ANÁLISE DAS INTERLEUCINAS NA EVIDÊNCIA DE EVENTOS TROMBÓTICOS

Avaliou-se diversas citocinas de pacientes com suspeita clínica de COVID-19 que apresentaram ou não algum evento trombótico confirmado. Observamos que no grupo que apresentou eventos trombóticos os níveis de interleucinas IL1b, IL-10 e IL2 eram significativamente mais elevados do que na ausência de evento trombótico (p<0,05). Com relação as interleucinas IL-6, IL-12, IL-8, IL-4, IFN- γ e TNF- α , os dados evidenciaram níveis mais altas de ambas as citocinas em pacientes com evento trombótico, todavia sem significância estatística (Tabela 6).

Tabela 7- Avaliação das citocinas na relação com eventos trombóticos para pacientes com suspeita para COVID-19 em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.

Parâmetro (pg/mL)	Trombose	N	\bar{X}	DP	Test-t	Valor p	Cohen's d
IL-12p70	Negativo	51	4,98	1,98	-1,62	0,11	-0,84

	Positivo	4	6,75	3,61			
IL1-β	Negativo	51	22,91	66,37	-2,5	0,02*	-1,30
	Positivo	4	137,52	254,15			
IL-8	Negativo	51	1628,58	3548,04	-0,86	0,39	-0,45
	Positivo	4	3240,43	4426,78			
IL-17	Negativo	51	36,9	68,78	0,07	0,94	0,03
	Positivo	4	34,48	35,09			
IFN-γ	Negativo	51	83,55	428,78	-0,09	0,93	-0,05
	Positivo	4	104,16	185,65			
TNF-α	Negativo	51	43,37	202,08	-0,78	0,44	-0,41
	Positivo	4	129,09	226,96			
IL-10	Negativo	51	39,84	91,59	-3,05	0,004*	-1,58
	Positivo	4	211,84	261,35			
IL-6	Negativo	51	601,19	2078,78	-1,06	0,29	-0,55
	Positivo	4	1737,08	1763,29			
IL-4	Negativo	51	16,75	17,46	-0,37	0,72	-0,19
	Positivo	4	20,01	9,38			
IL-2	Negativo	51	14,63	36,84	-3,19	0,002*	-1,66
	Positivo	4	117,38	212,77			

Fonte:Elaborada pela autora, 2023

Nota: N = número. \bar{X} = média. DP = desvio padrão. * = diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

Por fim, após relatar que concentrações maiores para as interleucinas 1 β , 2 e 10 foram encontradas em pacientes associados à eventos trombóticos e com características clínicas para COVID-19, foi verificado qual o tamanho de efeito da associação destas citocinas nestes pacientes (Tabela 7). A elevação de ambas interleucinas foi relacionada com eventos trombóticos. Para cada elevação de uma unidade da IL-1 β , ou seja, para cada picograma por mililitro de aumento da IL-1 β aumenta em 0,6% a razão de chances à evento trombótico para o paciente com características clínicas para COVID-19 (IC = 0,999 a 1,013), esse percentual aumenta para 1% quando se avalia a IL-2 (IC = 0,998 a 1,021,00) e a IL-10 (IC = 1,001 a 1,011). Um efeito significativo para a amostragem avaliada foi encontrado apenas para a IL-10 ($p = 0,02$) (Tabela 8).

Tabela 8- Efeito de associação das interleucinas 1 β , 2 e 10 em eventos trombóticos para pacientes hospitalizados com sintomas clínicos para COVID-19 em um hospital da região do Triângulo Mineiro, Brasil.

Evento trombótico (sim vs não)				
Preditor	IC (95%)			Valor p
	RC	LI	LS	
IL-1 β pg/mL	1,006	0,999	1,013	0,059
IL-2 pg/mL	1,01	0,999	1,021	0,061
IL-10 pg/mL	1,01	1,001	1,011	0,03*

Fonte:Elaborada pela autora, 2023

Nota: IC = Intervalo de confiança. RC = razão de chances. LI = limite inferior. LS = limite superior. Pg = picograma. mL = mililitro.

5 DISCUSSÃO

A infecção pelo COVID-19 não somente pode provocar uma ativação exacerbada de citocinas, mas também aumentar a incidência de eventos trombóticos nos pacientes. Sabe-se que a resposta inflamatória e a ativação de coagulação são duas respostas importantes na defesa contra a infecção, que não funcionam de forma independente, mas cooperam de forma complexa e síncrona (IBA; LEVY, 2018). É importantíssimo entendermos melhor como essa relação ocorre na infecção pelo SARSCoV-2, a fim de estabelecer protocolos de tratamento e diagnóstico para a doença.

Nessa perspectiva, analisamos a população de pacientes hospitalizados com COVID-19 na macrorregião do Triângulo Mineiro. Foi constatada uma taxa de eventos trombóticos significativa de 7,2% mesmo na vigência de medidas para trombopprofilaxia. Considerando ainda que se evidenciou nessa pesquisa entre os pacientes hospitalizados uma taxa de 53,6% de pacientes graves que necessitaram de intubação traqueal ou suporte intensivo. Elbadawi A. et al evidenciou uma incidência de eventos trombóticos agudos de 8,8% para pacientes em cuidados intensivos, taxa semelhante a encontrada em nosso estudo (ELBADAWI et al., 2020).

As plaquetas são cada vez mais reconhecidas como mediadores da inflamação e disfunção imune. Pacientes com COVID-19 correm maior risco de doença críticae mortalidade por todas as causas secundárias a um estado inflamatório aumentado. Assim, não é surpreendente que as plaquetas contribuam para sua fisiopatologiae desempenhem um papel significativo no desenvolvimento de complicações associadas ao COVID-19 (BARRETT et al., 2021). Barret T.J. et al em sua pesquisa evidenciou que entre 3.915 pacientes com infecção por

SARS-CoV-2 uma taxa de 20% de trombocitopenia (BARRETT et al., 2021). Essas informações, corroboram com dados desse estudo que encontrou uma taxa de plaquetopenia de 27,8%, apesar da amostra analisada ser menor.

Sabe-se que a doença grave de COVID-19 é acompanhada por redução da renovação eritrocitária, baixos níveis de hemoglobina e aumento das concentrações séricas de bilirrubina total e ferritina. Além disso, a expansão de progenitores eritróides no sangue periférico, juntamente com hipóxia, anemia e coagulopatias, está altamente correlacionada com gravidade e mortalidade (KRONSTEIN-WIEDEMANN et al., 2022). No nosso estudo, observou-se que nos casos que ocorreu evento trombótico a contagem de hemácias era significativamente mais baixa em comparação ao grupo que não apresentou evento ($p < 0,050$). Na malária, concentrações séricas elevadas de TNF- α correlacionam-se fortemente com o aumento da gravidade da doença e a IL-10 demonstrou regular negativamente o TNF- α . A anemia grave da malária tem sido associada à produção defeituosa de IL-10 em crianças (NUSSENBLATT et al., 2001). Em nosso estudo, observamos um aumento de ambas as citocinas TNF- α e IL-10 em pacientes com COVID-19 e evento trombótico, não deixando clara se há uma correlação entre as interleucinas e a presença de anemia.

Além disso, comprovamos a associação entre a resposta inflamatória e a ativação da coagulação, evidenciando a elevação nas dosagens das citocinas IL-1 β e IL-2 em pacientes com COVID-19 que apresentaram eventos trombóticos. Na COVID-19 sabemos que quando o vírus provoca uma lesão tecidual, as células imunes são recrutadas e as citocinas pró-inflamatórias são geradas e essas citocinas são mediadores da ativação de coagulação (BESTER; MATSHAILWE; PRETORIUS, 2018). Altos níveis de expressão de IL-1 β e IFN- γ foram detectados em pacientes com COVID-19 (YE; WANG; MAO, 2020). Com relação as interleucinas IL-12, IL-8, IFN-gama, IL-6, IL-4 e TNF- α , nossos dados mostram níveis mais altos de ambas as citocinas em pacientes com evento trombótico, todavia sem significância estatística.

Ainda, constatamos que nos pacientes com eventos trombóticos os níveis de interleucina IL-10, interleucina geralmente associada a mecanismos anti-inflamatórios, também eram mais elevados. Surpreendentemente, outros estudos também indicaram que pacientes com COVID-19 apresentam níveis elevados de citocinas secretadas por células Th2 (como IL-4 e IL-10), que inibem a resposta inflamatória (YE; WANG; MAO, 2020)

A princípio, a IL-10 foi descrita como Fator Inibitório da Síntese de Citocinas (CSIF)

como parte do padrão de citocinas Th2, mais tarde percebeu-se que a IL-10 também é produzida por células Th1 tardias. A IL-10 é um potente supressor das funções efetoras inflamatórias. No entanto, como várias outras citocinas, também pode promover proliferação, diferenciação e troca de classe de células B (BISWAS; BIEBER; MANZ, 2022), alguns estudos já constataram que a IL-10 é produzida por vários tipos de células, tem múltiplas funções, pode regular negativamente as células efetoras inflamatórias, mas também pode conduzir a inflamação. Isso justificaria o resultado do nosso estudo que identificou um aumento relevante da interleucina IL-10.

A hiperinflamação é uma condição potencialmente fatal associada a vários distúrbios clínicos caracterizados por ativação imune excessiva e dano tecidual. Múltiplas citocinas promovem o desenvolvimento de hiperinflamação; no entanto, a contribuição da IL-10 permanece obscura. Um estudo sobre linfo-histiocitose hemofagocítica (HLH), uma doença hiperinflamatória prototípica, sugerem que IL-18 e IL-10 podem promover coletivamente o início de um estado hiperinflamatório (TANG et al., 2022). Nos casos de COVID-19 grave há uma resposta inflamatória aguda exacerbada que é quase invariavelmente acompanhada por alterações do sistema de coagulação. Desta forma, a contribuição da IL-10 no processo da hiperinflamação pode favorecer o desenvolvimento de distúrbios de coagulação e de eventos trombóticos.

Hoje, a participação da IL-10 em fenômenos pró inflamatórios é amplamente aceita. Experimentos já sugeriram que essa citocina pode ativar o endotélio vascular, provocando a adesão de leucócitos. Em condições basais e na ausência de IL-10, as células endoteliais não permitem a adesão plaquetária, mas com o aumento da concentração de citocinas parece haver um estímulo seletivo e ordenado para os receptores de adesão plaquetária. Estudos indicaram que em altas doses, a IL-10 pode ser um fator essencial para o controle da proliferação de células endoteliais em diversos processos patológicos (GIMENO MJ et al., 2003). E isso pode justificar os achados do nosso estudo, que mostrou uma correlação positiva entre aumento da IL-10 e trombose.

Assim, apesar de parecer um pouco contraditória a associação encontrada entre o aumento da IL-10 e o aumento da chance de evento trombótico, tal achado pode ser justificado pela atuação redundante dessa interleucina que pode atuar também como inflamatória em algumas situações.

6 CONCLUSÕES

Em conformidade com o que foi apresentado nos resultados e discussões, pode-se concluir que níveis elevados de citocinas como IL-2, IL-1b e IL-10 estão correlacionados com complicações clínicas trombóticas em pacientes com sintomas respiratórios e suspeita de infecção por COVID-19. Além disso, constatamos que existe uma correlação positiva entre a IL-10 e o aumento de chance de se ter um evento trombótico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M. et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120–128, 9 jul. 2020.
- BARRETT, T. J. et al. Platelets contribute to disease severity in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 19, n. 12, p. 3139–3153, dez. 2021.
- BESTER, J.; MATSHAILWE, C.; PRETORIUS, E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 β , IL-6 and IL-8. **Cytokine**, v. 110, p. 237–242, out. 2018.
- BISWAS, S.; BIEBER, K.; MANZ, R. A. IL-10 revisited in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1 ago. 2022.
- DONG KIM, K. et al. Adaptive immune cells temper initial innate responses. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1248–1252, 23 out. 2007.
- ELBADAWI, A. et al. Incidence and Outcomes of Thrombotic Events in Symptomatic Patients With COVID-19. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 29 set. 2020.
- FIBRINOGEN STUDIES COLLABORATION. Plasma Fibrinogen Level and the Risk of Major Cardiovascular Diseases and Nonvascular Mortality. **JAMA**, v. 294, n. 14, 12 out. 2005.
- GIMENO MJ et al. Modulatory role of IL10 in endothelial cell damage and platelet adhesion. *Histol Histopathol.* . **Histol Histopathol.** , v. JUL, p. 695–702, 2003.
- GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.
- GUBERNATOROVA, E. O. et al. IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 53, p. 13–24, jun. 2020.
- HADID, T.; KAFRI, Z.; AL-KATIB, A. Coagulation and anticoagulation in COVID-19. **Blood Reviews**, v. 47, p. 100761, maio 2021.
- HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1123–1130, 1 jan.

2020.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 6 mar. 2021.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020.

IBA, T. et al. Coagulopathy in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 9, p. 2103–2109, set. 2020.

IBA, T.; LEVY, J. H. Inflammation and thrombosis: roles of neutrophils, platelets and endothelial cells and their interactions in thrombus formation during sepsis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 16, n. 2, p. 231–241, fev. 2018.

JIANG, S. et al. The association between severe COVID-19 and low platelet count: evidence from 31 observational studies involving 7613 participants. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 1, 9 jul. 2020.

KAPOOR, S. et al. Thromboembolic Events and Role of Point of Care Ultrasound in Hospitalized Covid-19 Patients Needing Intensive Care Unit Admission. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1483–1490, 6 dez. 2021.

KICHLOO, A. et al. COVID-19 and Hypercoagulability: A Review. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 26, p. 107602962096285, 1 jan. 2020.

KLOK, F. A. et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. **Thrombosis Research**, v. 191, p. 145–147, jul. 2020.

KRONSTEIN-WIEDEMANN, R. et al. SARS-CoV-2 Infects Red Blood Cell Progenitors and Dysregulates Hemoglobin and Iron Metabolism. **Stem cell reviews and reports**, v. 18, n. 5, p. 1809–1821, jun. 2022.

LEE, J. S.; SHIN, E.-C. The type I interferon response in COVID-19: implications for treatment. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 10, p. 585–586, 12 out. 2020.

LLITJOS, J. et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1743–1746, jul. 2020.

LU, P. et al. Pro-inflammatory effect of fibrinogen and FDP on vascular smooth muscle cells by IL-6, TNF- α and iNOS. **Life Sciences**, v. 88, n. 19–20, p. 839–845, maio 2011.

MIKACENIC, C. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. **Critical Care**, v. 22, n. 1, p. 358, 27 dez. 2018.

MOUSAVIZADEH, L.; GHASEMI, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in

pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 2, p. 159–163, abr. 2021.

NOPP, S. et al. Risk of venous thromboembolism in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 7, p. 1178–1191, out. 2020.

NUSSENBLATT, V. et al. Anemia and Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Erythropoietin Levels among Children with Acute, Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1164–1170, nov. 2001.

PACES, J. et al. COVID-19 and the Immune System. **Physiological Research**, p. 379–388, 30 jun. 2020.

PEELING, R. W. et al. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. **The Lancet**, v. 399, n. 10326, p. 757–768, fev. 2022.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 34, p. 101623, mar. 2020.

SAMUDRALA, P. K. et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, p. 173375, set. 2020.

TANG, Y. et al. Excessive IL-10 and IL-18 trigger hemophagocytic lymphohistiocytosis–like hyperinflammation and enhanced myelopoiesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 150, n. 5, p. 1154–1167, nov. 2022.

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, dez. 2020.

WANG, J. et al. COVID-19: imbalanced cell-mediated immune response drives to immunopathology. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 2393–2404, 31 dez. 2022.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782, 25 ago. 2020.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239, 7 abr. 2020.

YANG, L. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 128, 25 jul. 2020a.

YANG, X. et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1469–1472, jun. 2020b.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in

COVID-19. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, jun. 2020.

ZHANG, Y. et al. Profile of natural anticoagulant, coagulant factor and anti-phospholipid antibody in critically ill COVID-19 patients. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 50, n. 3, p. 580–586, 9 out. 2020.