



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Ana Gabriela Fumagali

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO SARS-COV-2 EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS MALIGNAS**

Florianópolis

2022

Ana Gabriela Fumagali

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO SARS-COV-2 EM PACIENTES COM  
NEOPLASIAS MALIGNAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cláudia Santos da Silva.  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fumagali, Ana Gabriela

Avaliação da resposta imune ao SARS-CoV-2 em pacientes com neoplasias malignas / Ana Gabriela Fumagali ; orientadora, Maria Cláudia Santos da Silva, coorientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2022.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. SARS-CoV-2. 3. Resposta imune. 4. Citometria de fluxo. I. Santos da Silva, Maria Cláudia. II. Dalmarco, Eduardo Monguilhott. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Ana Gabriela Fumagali

**Avaliação da Resposta Imune ao SARS-CoV-2 em Pacientes com Neoplasias Malignas**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 07 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Dra. Izabel Galhardo Demarchi  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Rodolfo Patussi Correia  
Beckman Coulter Life Science

Dra. Adriana Scotti da Silva  
Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmácia.

---

Profª. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

---

Profª. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientadora

Florianópolis

2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, à minha família e ao meu noivo. A realização dessa etapa profissional e pessoal só foi possível com a ajuda e o incentivo das pessoas mais importantes da minha vida, que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, por ter aceitado me orientar neste trabalho, por todos os ensinamentos compartilhados, pela confiança que me foi depositada e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Agradeço por ter me recebido de braços abertos desde que cheguei no mestrado. Foi um prazer conviver e aprender com uma profissional que ama o que faz.

Agradeço ao meu coorientador, Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, por todo o conhecimento compartilhado para minha formação acadêmica e por sempre estar disponível para me auxiliar.

Agradeço à minha amiga Laura, que esteve ao meu lado durante toda a minha trajetória no mestrado e com quem eu compartilhei inúmeros momentos. Agradeço por todos os ensinamentos e por ter tornado essa jornada muito mais fácil e prazerosa.

Agradeço às meninas do laboratório de marcadores celulares do HU, à Helo que sempre esteve disponível para me ensinar e me auxiliar, e à Íris e à Chandra por todo o auxílio durante a execução do meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos do LOEH, à Lis e à Rafa, pelo auxílio nos experimentos, por todo o suporte durante a realização do mestrado e pelos inúmeros momentos compartilhados. À Amanda, Bruna, Nati, Dani e ao João, por todos os momentos que tornaram essa trajetória mais leve e mais alegre, e que também contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço à toda equipe que fez parte do Projeto COVID-19: Taína, Júlia e Eduarda; À professora Ana e à professora Iara; Às doutoras Andressa, Ivete, Patrícia e Magali; E à todos os profissionais do HU, que auxiliaram na coleta das amostras, e em especial à Cida, que sempre se mostrou disponível para me ajudar na execução deste trabalho.

Agradeço aos membros avaliadores da banca, pela disponibilidade em avaliar essa dissertação.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, ao CNPq, à CAPES e à empresa JBS, pela possibilidade de realização deste trabalho.

E principalmente, agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

“A sua estrada é somente sua. Outros podem acompanhá-lo, mas ninguém pode andar por você.” (Rumi)

## RESUMO

Pacientes portadores de neoplasias apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e maior probabilidade de evoluir para desfechos graves. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune em pacientes com neoplasias malignas infectados pelo SARS-CoV-2, pela análise das células imunes no sangue periférico e das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios. Para isso, 58 indivíduos foram incluídos no estudo, desses, 28 pacientes com diagnóstico de COVID-19 (14 pacientes oncológicos e 14 não oncológicos) e 30 indivíduos considerados saudáveis, como grupo controle. As células imunes e as citocinas plasmáticas foram avaliadas por citometria de fluxo. As concentrações de mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO) foram determinadas por métodos colorimétricos. Os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentaram redução de linfócitos T, linfócitos B e células NK, em comparação com o grupo controle. Dentro do compartimento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foi observado um aumento da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Além disso, também foi observado aumento dos valores relativos de neutrófilos e da relação N/L e aumento de neutrófilos com expressão de CD62L. No compartimento monocítico foram evidenciadas diminuição de monócitos não clássicos (ncMO) e expressão do marcador atípico CD56 em monócitos. Além disso, foi constatado diminuição da expressão de HLA-DR nos monócitos clássicos (cMO) e ncMO. Ademais, a análise das células dendríticas (DCs) mostrou uma diminuição dessa população celular nos pacientes oncológicos, com alterações dentro do compartimento das DCs, onde foi observado um aumento de células dendríticas clássicas/mieloides (mDCs) e diminuição de células dendríticas plasmocitoides (pDCs). Em relação à análise dos mediadores inflamatórios, os pacientes oncológicos também apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de IL-12p70, IL-6 e IL-10. No entanto, as concentrações de IL-17A e óxido nítrico apresentaram-se diminuídas. Os resultados obtidos indicam uma resposta imune mais severamente desregulada nos pacientes oncológicos infectados pelo vírus SARS-CoV-2. Embora apresentem uma resposta de citocinas pró-inflamatórias, com elevação de IL-6, IL-12p70, esses pacientes apresentam um quadro imunossupressor, caracterizado pela intensa linfopenia, diminuição da expressão de HLA-DR em monócitos, aumento da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e concentrações elevadas de IL-10. O comprometimento desencadeado no sistema imune pelo SARS-CoV-2 em pacientes portadores de neoplasias malignas, já debilitado pelo câncer, potencializa ainda mais a disfunção imune, o que leva a gravidade da COVID-19 nesses pacientes.

**Palavras-chave:** COVID-19; SARS-CoV-2; Neoplasia; Imunidade; Pacientes oncológicos.

## ABSTRACT

Patients with cancer are more susceptible to infection by the SARS-CoV-2 virus and are more likely to develop serious outcomes. In this context, the objective of this study was to evaluate the immune response in patients with malignant neoplasms infected by SARS-CoV-2, by analyzing immune cells in peripheral blood and plasma concentrations of inflammatory mediators. For this, 58 individuals were included in the study, of which 28 patients diagnosed with COVID-19 (14 oncology patients and 14 non-oncology patients) and 30 individuals considered healthy, as a control group. Immune cells and plasma cytokines were evaluated by flow cytometry. Myeloperoxidase (MPO) and nitric oxide (NO) concentrations were determined by colorimetric methods. Cancer patients with COVID-19 showed a reduction in T lymphocytes, B lymphocytes and NK cells compared to the control group. Within the CD4+ and CD8+ T lymphocyte compartment, an increase in the proportion of CD4+ CD25+ and CD8+ CD25+ T lymphocytes was observed. In addition, an increase in the relative values of neutrophils and the N/L ratio and an increase in neutrophils with CD62L expression were also observed. In the monocytic compartment, there was a decrease in non-classical monocytes (ncMO) and expression of the atypical marker CD56 in monocytes. In addition, a decrease in HLA-DR expression was observed in classic monocytes (cMO) and ncMO. Furthermore, analysis of dendritic cells (DCs) showed a decrease in this cell population in cancer patients, with changes within the DC compartment, where an increase in classic/myeloid dendritic cells (mDCs) and a decrease in plasmacytoid dendritic cells (pDCs) was observed. Regarding the analysis of inflammatory mediators, cancer patients also had elevated plasma concentrations of IL-12p70, IL-6 and IL-10. However, the concentrations of IL-17A and nitric oxide were reduced. The results obtained indicate a more severely deregulated immune response in cancer patients infected with the SARS-CoV-2 virus. Although they have a pro-inflammatory cytokine response, with elevation of IL-6, IL-12p70, these patients have an immunosuppressive condition, characterized by intense lymphopenia, decreased expression of HLA-DR in monocytes, increased proportion of CD4+ and CD8+ CD25+ T lymphocytes and high concentrations of IL-10. The impairment triggered in the immune system by SARS-CoV-2 in patients with malignant neoplasms, already weakened by cancer, further enhances immune dysfunction, which leads to the severity of COVID-19 in these patients.

**Keywords:** COVID-19; SARS-CoV-2; Neoplasm; Immunity; Oncology patients.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura viral e genoma do vírus SARS-CoV-2 .....	18
Figura 2 – Mecanismo de entrada viral do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras.....	19
Figura 3 – Casuística .....	28
Figura 4 – Contagem absoluta de leucócitos e linfócitos totais no sangue periférico.....	36
Figura 5 - Contagem relativa de linfócitos totais no sangue periférico.....	36
Figura 6 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T no sangue periférico.....	37
Figura 7 - Contagem absoluta de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> no sangue periférico.....	38
Figura 8 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no sangue periférico.....	38
Figura 9 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos B no sangue periférico.....	39
Figura 10 - Contagem absoluta e relativa de células NK no sangue periférico.....	40
Figura 11 - Contagem absoluta e relativa de neutrófilos no sangue periférico e relação N/L..	42
Figura 12 - Contagem absoluta e relativa de eosinófilos e basófilos no sangue periférico.....	43
Figura 13 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T reguladores (Treg) no sangue periférico.....	50
Figura 14 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T reguladores Naive (Treg N) no sangue periférico.....	50
Figura 15 - Contagem absoluta de linfócitos T reguladores de memória (Treg M) no sangue periférico.....	51
Figura 16 - Contagem absoluta dos linfócitos B N, transicionais, BM-NS, BM-CS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico.....	53
Figura 17 - Contagem relativa de linfócitos B transicionais, BM-NS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico.....	54
Figura 18 - Expressão de CD62L em neutrófilos.....	56
Figura 19 - Contagem absoluta e relativa de monócitos no sangue periférico.....	58
Figura 20 - Monócitos clássicos (cMO).....	59
Figura 21 - Monócitos não-clássicos (ncMO).....	60
Figura 22 - Macrófagos teciduais (TIMAS).....	61
Figura 23 - Contagem absoluta e relativa de células dendríticas e seus subconjuntos em sangue periférico.....	65
Figura 24 - Concentrações plasmáticas das citocinas IL-12p70, IL-6, IL-10 e IL-17A.....	67

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Painel de anticorpos monoclonais .....	29
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos pacientes .....	34
Tabela 2 – Maturação dos linfócitos T .....	44
Tabela 3 – Ativação dos linfócitos T .....	48
Tabela 4 – Expressão de HLA-DR em monócitos .....	62
Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de MPO e NO .....	69
Tabela 6 – Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG .....	71
Tabela 7 – Variáveis correlacionadas com o desfecho óbito.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Análise de Variância

BM B de Memória

BM-CS, do inglês *class-switched*-BM

BV421 Brilliant Violet 421

CBA Cytometric Bead Array

CD do inglês *cluster of differentiation*

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CM Memória Central

cMO Monócitos Clássicos

COVID-19 do inglês, *Coronavirus Disease 2019*

DCs Células Dendríticas

DP Linfócito T Duplo-Positivo

DN Linfócito T Duplo-Negativo

E Envelope

ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

EDTA/K3 Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético/Tripotássico

EM Efetor de Memória

EMRA Efetor Terminal CD45RA+

FITC Isotiocianato de Fluoresceína

GD Linfócito T Gama Delta

HCl Ácido Clorídrico

hECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2 Humana

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA Antígeno Leucocitário Humano

HRP Peroxidase de Rábano do inglês *horseradish peroxidase*

IFM Intensidade de Fluorescência Média

IFN Interferon

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

IMC Índice de Massa Corporal

iMO Monócitos Intermediários

M Membrana

mDCs Células Dendríticas Mieloides ou Clássicas

MERS Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

MPO Mieloperoxidase

N Nucleocapsídeo

N/L Razão Neutrófilo-Linfócito

NaOH Hidróxido De Sódio

ncMO Monócitos Não Clássicos

NK do inglês, *natural killer*

NO<sub>2</sub>- Nitrito

NO<sub>3</sub>- Nitrato

NO Óxido Nítrico

NRP1 Neuropilina-1

NS-BM do inglês, *non-switched-BM*

OMS Organização Mundial da Saúde

PacB Pacific Blue

PacO Pacific Orange

PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMCs Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS Tampão Fosfato-Salina

PCR Proteína C Reativa

pDCs Células Dendríticas Plasmocitoides

PE Ficoeritrina

PECy7 Ficoeritrina Cy7

PerCP Cy5-5 Peridina-Clorofila-Proteína

PRRs Receptores de Reconhecimento de Padrões

RT-PCR Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real

S do inglês, *spike*

SARS do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SARS-CoV-2 Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SP Sangue Periférico

SRAG Síndrome Respiratória Aguda Grave

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR Receptor de Células T do inglês *T-cell receptor*

TEV Tromboembolismo Venoso

Th Linfócito T Auxiliar

TIMAS Macrófagos Teciduais

TMB Tetrametilbenzidina

TMPRSS2 Serina Protease Transmembrana Tipo 2

TNF Fator de Necrose Tumoral

Treg Linfócito T Regulador

Treg M Linfócito T Regulador de Memória

Treg N Linfócito T Regulador Naive

UTI Unidade de Terapia Intensiva

VOC Variante de Preocupação

VOI Variante de Interesse

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	SURGIMENTO DA COVID-19 .....	16
2.2	CORONAVÍRUS E O SARS-COV-2.....	16
2.3	MECANISMO DE ENTRADA DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS .....	18
<b>2.3.1</b>	<b>Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2).....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Neuropilina-1 (NRP1).....</b>	<b>20</b>
2.4	PATOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19 .....	20
2.5	RESPOSTA IMUNE NA COVID-19 .....	21
2.6	COVID-19 E CÂNCER.....	23
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	27
4.2	POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM .....	27
4.3	IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	28
<b>4.3.1</b>	<b>Painel de anticorpos monoclonais .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Protocolos de marcação.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Análise da expressão de HLA-DR, CD62L e CD56.....</b>	<b>31</b>
4.4	DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS .....	31
4.5	DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG.....	32
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	32
4.7	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	33
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES .....	34
5.2	ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNES CIRCULANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	35
<b>5.2.1</b>	<b>Celularidade Total.....</b>	<b>35</b>

5.2.2	Análise dos linfócitos T - maturação.....	44
5.2.3	Análise dos linfócitos T - ativação .....	46
5.2.4	Linfócitos T reguladores (Treg) .....	49
5.2.5	Análise dos linfócitos B.....	51
5.2.6	Análise da maturação dos neutrófilos e expressão da molécula CD62L .....	55
5.2.7	Análise dos monócitos .....	56
5.2.8	Análise da expressão de HLA-DR nos monócitos.....	61
5.2.9	Análise das células dendríticas (DCs) .....	63
5.3	ANÁLISE DAS CITOCINAS PLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	66
5.4	ANÁLISE DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS: MPO E NO .....	69
5.5	ANÁLISE DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG.....	70
5.6	VARIÁVEIS CORRELACIONADAS COM O DESFECHO ÓBITO .....	71
6	CONCLUSÕES.....	73
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	75
8	PERSPECTIVAS.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APÊNDICE A - Análise das células imunes circulantes em sangue periférico por citometria de fluxo.....	92
	APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	98
	APÊNDICE C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos .....	102
	APÊNDICE D – Questionário para coleta de dados dos pacientes.....	109

## 1 INTRODUÇÃO

O novo coronavírus, designado SARS-CoV-2, causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), foi identificado no início de janeiro de 2020 após um surto de pneumonia viral na cidade de Wuhan, na China (EJAZ et al., 2020; GOSAIN et al., 2020; HU et al., 2021). Devido a sua alta transmissibilidade, o vírus se disseminou rapidamente por todo o mundo, levando a pandemia da COVID-19. Estima-se que mais de 500 milhões de casos e mais de 6 milhões de mortes ocorreram até o mês de junho de 2022 (WHO, 2022). Nesse mesmo período, o Brasil contabilizou mais de 30 milhões de casos e mais de 600 mil óbitos em decorrência da COVID-19 (BRASIL, 2022).

O curso clínico da COVID-19 é heterogêneo, as manifestações clínicas variam desde sintomas respiratórios como febre, tosse seca e fadiga, até sintomas debilitantes persistentes e ao óbito (BRODIN, 2021; FRATER et al., 2020). Os pacientes que evoluem para casos graves da COVID-19 desenvolvem complicações tromboembólicas, hiperinflamação sistêmica, síndrome do desconforto respiratório agudo e podem evoluir para falência de múltiplos órgãos (WALTER et al., 2022a). Além de ter sido observado que o risco da COVID-19 aumenta com a idade (BRODIN, 2021), muitos dos pacientes que evoluíram para as formas graves da doença apresentaram evidências de comorbidades preexistentes, entre elas, doenças cardiovasculares, pulmonares, renais e câncer (EJAZ et al., 2020).

Como o SARS-CoV-2 entra na célula alvo, a gravidade da COVID-19 parece ser modulada não somente pela infecção viral, mas também pela resposta imune e inflamatória desregulada do hospedeiro (BOECHAT et al., 2021). Ao entrar na célula alvo, a infecção pelo SARS-CoV-2 gera uma resposta imunológica, inata e adaptativa (LI, X. et al., 2020). Após serem recrutados, os linfócitos T respondem rapidamente à infecção e desencadeiam uma resposta inflamatória com ativação de citocinas, com o intuito de combater o patógeno (GOSAIN et al., 2020). É observado, nos casos mais graves da doença, uma ativação descontrolada dessa resposta inflamatória (YANG et al., 2020), o que desencadeia uma “tempestade de citocinas”, que é a principal causa de SARS e falência de múltiplos órgãos (BAKOUNY et al., 2020; HU et al., 2020; YE et al., 2020). Diante da hiperinflamação, observa-se falhas nos mecanismos de defesa da imunidade inata que parecem estar relacionados com as formas mais críticas da doença, o que contribui para a rápida disseminação viral e a desregulação do sistema imune. A resposta imune adquirida, quando amplificada, pode ser extremamente prejudicial ao hospedeiro, principalmente nos indivíduos com comorbidades coexistentes (BOECHAT et al., 2021).

Sabe-se que indivíduos com neoplasias malignas, em geral, são mais suscetíveis a infecções, pois apresentam frequentemente múltiplos fatores de risco, doenças crônicas coexistentes e estado de saúde debilitado associado a imunossupressão decorrente diretamente do câncer ou do tratamento antineoplásico (BAKOUNY et al., 2020; DAI et al., 2020; TARTARONE; LEROSE, 2020). Evidências indicam também, que a linfopenia é um indicador independente de mau prognóstico em pacientes com COVID-19 (CHEN; WHERRY, 2020; TAN et al., 2020), o que é um achado frequente em pacientes oncológicos e, portanto, indica que a resposta imune necessária para combater o vírus está comprometida nesses pacientes (GOSAIN et al., 2020). Além disso, estudos demonstraram que pacientes com câncer exibem uma resposta de citocinas inflamatórias exacerbada, o que contribui para o aumento da mortalidade nesses pacientes (AMERE SUBBARAO, 2021). As razões para alta incidência de indivíduos com COVID-19 nesse subgrupo podem estar associadas a fatores biológicos e imunológicos (BAKOUNY et al., 2020). Assim, neste estudo foi avaliada a resposta imune em pacientes com neoplasias malignas e infectados com o vírus SARS-CoV-2, a fim de identificar novos biomarcadores de prognóstico nesses indivíduos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SURGIMENTO DA COVID-19

Em dezembro de 2019, várias unidades de saúde na cidade de Wuhan, na China, relataram um surto de pneumonia de etiologia desconhecida. Os pacientes apresentavam sintomas clínicos semelhantes aos da síndrome respiratória aguda grave (SARS) e síndrome respiratória do oriente médio (MERS) (HU et al., 2020). Os primeiros registros de pacientes hospitalizados estavam epidemiologicamente ligados ao mercado de frutos do mar, Huanan Seafood Wholesale Market, localizado no centro de Wuhan, que além da comercialização de frutos do mar, também é responsável pela venda de animais selvagens vivos (CHAMS et al., 2020; HU et al., 2020; HOLMES et al., 2021). Em janeiro de 2020, foi confirmado que o agente etiológico responsável pelo surto de pneumonia viral tratava-se de um novo coronavírus, posteriormente denominado SARS-CoV-2, e a doença ficou conhecida como COVID-19 (UDDIN et al., 2020). Em 10 de janeiro de 2020, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China (CDC) tornou pública a primeira sequência do genoma viral (CHAMS et al., 2020). A sequência genômica do SARS-CoV-2, embora apresente aproximadamente 80% de compatibilidade com SARS-CoV, parecia estar diretamente relacionada a vários coronavírus de morcegos, em particular o *RaTG13* (UDDIN et al., 2020).

Os coronavírus infectam uma ampla gama de hospedeiros, incluindo morcegos, pangolins, pássaros, camundongos e humanos (ASSELAH et al., 2020). O SARS-CoV-2 tem alta semelhança genética com o coronavírus de morcego denominado “*RaTG13*” detectado em *Rhinolophus affinis*, o que sustenta a hipótese de que o SARS-CoV-2 provavelmente se originou em morcegos (HU et al., 2020; WANG, M. et al., 2020), enquanto um hospedeiro intermediário pode ter exercido o papel na disseminação da doença para os humanos (DHAMA et al., 2020). Estudos sugerem que devido à alta similaridade genética entre coronavírus isolado de pangolins com a cepa humana, os pangolins são considerados potenciais hospedeiros intermediários (WANG, M. et al., 2020).

### 2.2 CORONAVÍRUS E O SARS-COV-2

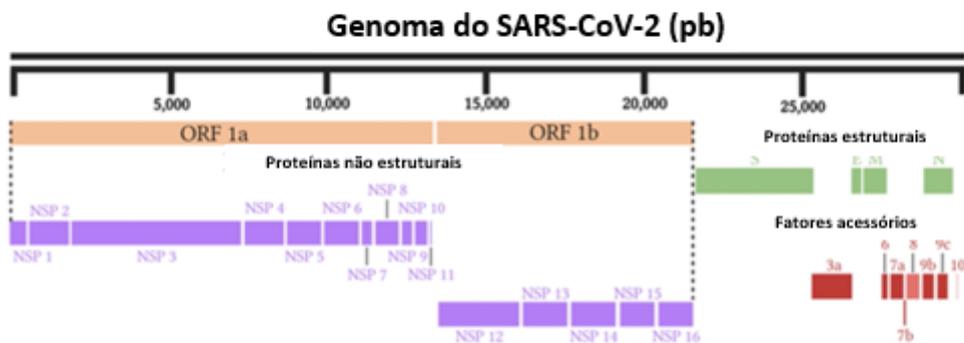
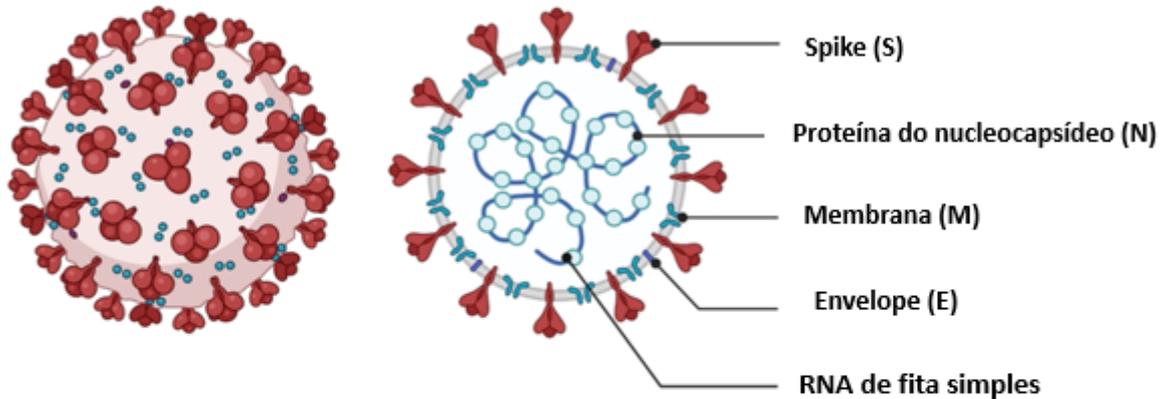
Os primeiros coronavírus humanos foram identificados na década de 1960, quando os indivíduos infectados apresentavam sintomas respiratórios leves (UDDIN et al., 2020). Os coronavírus são vírus envelopados de RNA de fita simples, de sentido positivo, pertencentes à

família *Coronaviridae*. Eles são subdivididos em quatro gêneros alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ). Entre esses, apenas os gêneros  $\alpha$  e  $\beta$  são considerados patogênicos para mamíferos e humanos (LI, X. et al., 2020; SAMUDRALA et al., 2020; WANG, M. et al., 2020). O SARS-CoV-2 pertence ao gênero beta-coronavírus, no qual também inclui o SARS-CoV e o MERS-CoV (CHAMS et al., 2020), que foram responsáveis pelos surtos de coronavírus nas duas últimas décadas, a SARS e a MERS, em 2002 e 2012, respectivamente (DHAMA et al., 2020). Assim como outros coronavírus, o SARS-CoV-2 é um vírus de RNA envelopado, de fita simples e de sentido positivo, com um genoma de aproximadamente 30 kb (UDDIN et al., 2020). Dois terços do genoma viral codificam proteínas não estruturais, que são necessárias para a replicação viral e sua patogênese, enquanto o terço restante codifica proteínas estruturais e acessórias, incluindo as principais proteínas estruturais: proteína de pico (S=spike), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e envelope (E) (MOAZZAM et al., 2020). A proteína S é considerada a principal proteína estrutural, fundamental na patogênese e virulência do vírus, devido a sua interação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (KUMAVATH et al., 2021), o qual é o principal receptor para entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras (JACKSON et al., 2020).

Assim como outros vírus de RNA, o SARS-CoV-2 apresenta elevado grau de mutação (ZHOU; ZHU; CHU, 2022). As variantes virais são decorrentes de alterações de nucleotídeos que ocorrem no genoma viral durante o processo de replicação (CHAVDA; PATEL; VAGHASIYA, 2022; MISTRY et al., 2022). A Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou as variantes em: variante de preocupação (VOC) e variante de interesse (VOI). Atualmente, cinco variantes de preocupação foram identificadas:  $\alpha$  (B.1.1.7),  $\beta$  (B.1.351),  $\gamma$  (P.1),  $\delta$  (B.1.617.2) e, mais recentemente, a Ômicron (B.1.1.529), que apresenta um grande número de mutações, principalmente na proteína spike (CHAVDA; PATEL; VAGHASIYA, 2022; ZHOU; ZHU; CHU, 2022), que é o alvo das principais vacinas disponíveis atualmente (MISTRY et al., 2022).

Figura 1 - Estrutura viral e genoma do vírus SARS-CoV-2.

### Estrutura do vírus SARS-CoV-2 humano



Acima estão descritos os elementos estruturais do vírus SARS-CoV-2, incluindo as proteínas estruturais: proteína spike, proteína do nucleocapsídeo, proteína de membrana e proteína do envelope e o RNA viral de fita simples. Abaixo estão descritos os componentes do genoma viral (Adaptado de JAMISON *et al.*, 2022).

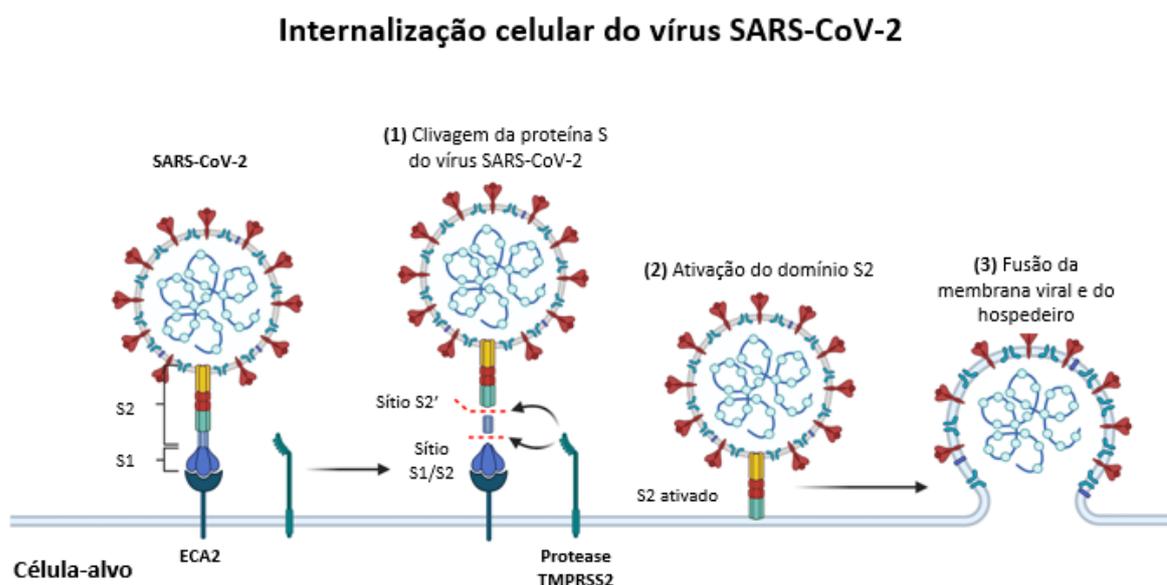
## 2.3 MECANISMO DE ENTRADA DO SARS-COV-2 NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

### 2.3.1 Enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)

Na maioria das células alvo, a proteína S do SARS-CoV-2 liga-se ao seu principal receptor celular, a ECA2 (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022; JACKSON *et al.*, 2021). Além da ECA2 humana (hECA2), o SARS-CoV-2 também reconhece a ECA2 de porco, furão, gato, cachorro, coelho, civeta, macaco-rhesus e pangolim (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020; ZHAO, X. *et al.*, 2020; ZHOU, P. *et al.*, 2020). Esse amplo reconhecimento de receptores confere uma ampla gama de hospedeiros ao SARS-CoV-2 (HU *et al.*, 2020).

Assim como outros coronavírus, a entrada celular do SARS-CoV-2 depende não somente da interação da proteína S com o receptor ECA2, mas também do processamento proteolítico da proteína S (HOFFMANN et al., 2020; HU et al., 2020). Estudos demonstraram que proteases do hospedeiro, incluindo a serina protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), catepsina L e furina, participam da clivagem da proteína S, o que permite a entrada do SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020; HU et al., 2020; OU et al., 2020; SHANG et al., 2020). A proteína S apresenta duas subunidades. O domínio S1 da proteína S é responsável pela ligação ao receptor da célula e o domínio S2 é responsável pela fusão da membrana viral com a membrana celular (MOAZZAM et al., 2020). A clivagem proteolítica nos sítios S1/S2 e S2' da proteína S, pelas proteases do hospedeiro, é fundamental na modulação do tropismo viral e patogenicidade (WALLS et al., 2020). A ligação da proteína S às células do hospedeiro permite a fusão das membranas virais e do hospedeiro, o que possibilita a liberação do RNA viral diretamente no citoplasma. Em algumas células, o SARS-CoV-2 também pode ser internalizado por via endocítica. Após a clivagem pela catepsina ocorre a fusão da membrana viral com a membrana endossomal e facilita a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Após a entrada, o RNA é traduzido em proteínas pela maquinaria da célula e as proteínas e o RNA são montados em um novo vírion no complexo de Golgi, que, posteriormente, serão liberados (AHMED-HASSAN et al., 2020).

Figura 2 - Mecanismo de entrada viral do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras.



Interações estruturais entre o vírus e a célula hospedeira. Estão descritas a interação entre a proteína S (Spike) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), além da atividade da serina protease transmembrana

tipo 2 (TMPRSS2) em clivar a proteína S e mediar a internalização celular do vírus SARS-CoV-2 (Adaptado de JAMISON *et al.*, 2022).

### 2.3.2 Neuropilina- 1 (NRP1)

Assim como o SARS-CoV, o SARS-CoV-2 utiliza a ECA2 para entrar nas células hospedeiras, no entanto, diferenças no tropismo tecidual entre os dois coronavírus foram reveladas. Visto que o SARS-CoV-2 infecta outros tecidos, além do sistema respiratório, como coração e cérebro, assim como tecidos com baixa expressão da ECA2, isso indica que fatores adicionais do hospedeiro possam estar envolvidos na entrada viral (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2020; ABEBE *et al.*, 2021). Alguns estudos demonstraram que a neuropilina-1 (NRP1) é um importante correceptor que facilita a entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras (LI, Z.; BUCK, 2021; DALY *et al.*, 2020; CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2020). Em uma revisão conduzida por Gudowska-Sawczuk e Mroczko (2021) foi relatado que a presença da NRP1 nas células hospedeiras aumenta a infecção e a disseminação viral. As neuropilinas são glicoproteínas de superfície transmembrana que participam de uma ampla gama de processos biológicos, com a NRP1 desempenhando um importante papel na tumorigênese e na imunidade (CHUCKRAN *et al.*, 2020). A expressão da NRP1 em humanos é observada principalmente em células dendríticas e em linfócitos T reguladores. Também tem sido observada a expressão de NRP1 na vasculatura tumoral, onde a superexpressão de NRP1 é associada à mau prognóstico no câncer (CHAUDHARY *et al.*, 2013; PRUD'HOMME; GLINKA, 2012). Em vários tipos de câncer a NRP1 é regulada de maneira positiva e contribui para a sobrevivência e proliferação tumoral (RIZZOLIO; TAMAGNONE, 2011). O enriquecimento de células T reguladoras NRP1 positivas é observado tanto intratumoral, quanto em locais periféricos, e é evidenciado em vários tipos de neoplasias malignas (CHUCKRAN *et al.*, 2020). Em um estudo que avaliou a patogênese da COVID-19 em pacientes com cânceres renais, identificaram que juntamente com a expressão de ECA2, a alta expressão de NRP1 em cânceres renais, pode desempenhar um significativo papel no risco de infectividade pelo vírus SARS-CoV-2, e na sobrevida desses pacientes (HOSSAIN; AKTER; UDDIN, 2021).

## 2.4 PATOGÊNESE E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19

Após a entrada viral por meio da interação com o principal receptor do hospedeiro, a ECA2, a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 desencadeia manifestações clínicas heterogêneas,

que variam de sintomas leves à insuficiência respiratória grave (LOWERY; SARIOL; PERLMAN, 2021; HU et al., 2020; VAN EIJK et al., 2021). O SARS-CoV-2 é transmitido por gotículas respiratórias e por aerossóis, e os indivíduos infectados apresentam sinais clínicos após um período de incubação de aproximadamente 5 dias (LAMERS; HAAGMANS, 2022). Grande parte dos pacientes apresentam um quadro clínico leve ou permanecem assintomáticos, o que compreende cerca de 80% dos indivíduos infectados (JAMAL et al., 2021). Os sintomas mais comumente relatados são febre, fadiga, tosse seca e mialgia (DHAMA et al., 2020). Além disso, sintomas como dor de cabeça, diarreia, dor de garganta, calafrios, náuseas e vômitos também são relatados (HU et al., 2020). Também pode ocorrer anosmia (perda do olfato) e disgeusia (alteração do paladar) (MOAZZAM et al., 2020). Cerca de 10% a 20% dos pacientes desenvolvem pneumonia grave, e, próximo de 5%, evoluem para um quadro crítico, com desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), choque séptico, e podem evoluir para falência múltipla de órgãos (JAMAL et al., 2021). A doença grave se desenvolve aproximadamente uma semana após o início dos sintomas (LAMERS; HAAGMANS, 2022) e entre as complicações clínicas da COVID-19, a SRAG é considerada a principal causa de morte em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 (MORTAZ et al., 2020).

Alguns pacientes podem evoluir para um quadro clínico grave e desenvolver complicações que afetam vários sistemas orgânicos (WALTER et al., 2022a). Sabe-se que indivíduos com idade avançada apresentam um fator de risco importante para desenvolver pneumonia crítica e a mortalidade aumenta acentuadamente a partir dos 65 anos (MERAD et al., 2022). Pacientes com comorbidades subjacentes como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças renais, doenças hepáticas, neoplasias malignas e estado de imunossupressão, também apresentam fator de risco para evoluir para as formas mais graves da doença e apresentam maior mortalidade em decorrência da COVID-19 (UDDIN et al., 2020).

## 2.5 RESPOSTA IMUNE NA COVID-19

A gravidade da COVID-19 parece ser modulada não somente pela infecção viral, mas também pelo desequilíbrio da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (BOECHAT et al., 2021). A infecção pelo SARS-CoV-2 desencadeia respostas imunes inatas e adaptativas (JAMAL et al., 2021). A partir do reconhecimento viral por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), o sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro, que induz uma resposta inflamatória com o intuito de limitar a infecção viral e de eliminar o patógeno (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). A patogênese da COVID-19 está

diretamente relacionada a uma profunda desregulação da resposta imune inata (PALUDAN; MOGENSEN, 2022). No início da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, a resposta imune é suprimida, o que favorece a rápida propagação viral. Posteriormente, de modo a compensar a falha na resposta inicial, o sistema imune desencadeia uma resposta inflamatória exacerbada e tardia (JIMENÉZ; ARIAS, 2022).

Uma resposta imune eficiente é imprescindível para a defesa do hospedeiro frente a uma infecção viral, dessa maneira, a desregulação da resposta imune traz graves prejuízos para os indivíduos infectados (BARKSDALE et al., 2022). Danos teciduais locais e sistêmicos, assim como complicações duradouras são reflexos de uma resposta imune inata hiperinflamatória e uma resposta adaptativa ineficaz contra a infecção pelo SARS-CoV-2 (VAN EIJK et al., 2021). Os pacientes com COVID-19, principalmente os criticamente doentes, apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias séricas, que incluem as interleucinas: IL-6, IL-2, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (WALTER et al., 2022a), e podem desencadear um quadro de hiperinflamação sistêmica (JIMENÉZ; ARIAS, 2022). As concentrações séricas de IL-6, IL-8 e TNF são marcadores independentes de gravidade da COVID-19 (DEL VALLE et al., 2020; WONG; PERLMAN, 2022). Em contrapartida, as respostas de interferon (IFN) tipo I e III, que são protagonistas da resposta antiviral inata, estão diminuídas e retardadas em pacientes com COVID-19, e, isso é evidenciado no decorrer da doença grave (GALANI et al., 2020). Diversas células imunes estão envolvidas no desequilíbrio da resposta inflamatória, como os macrófagos e os neutrófilos, as quais, posteriormente, induzirão os mediadores inflamatórios. Células epiteliais e endoteliais, também estão envolvidas e corroboram para a exacerbação da resposta inflamatória (PALUDAN; MOGENSEN, 2022).

Análises de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com COVID-19 grave evidenciam linfopenia acentuada e expressão de marcadores de ativação e de exaustão nas células T (DE BIASI et al., 2020; TAVAKOLPOUR et al., 2020). A linfopenia é um dado clínico comum em pacientes graves, e pode contribuir para eliminação viral ineficaz (WONG; PERLMAN, 2022). Outra característica clínica da desregulação imunológica é o aumento da razão neutrófilo-linfócito (N/L), que é considerado um marcador prognóstico independente, indicativo de gravidade para a COVID-19 (JAMAL et al., 2021). O sistema fagocitário mononuclear, composto pelas células dendríticas (DCs) e monócitos, no sangue periférico, parece ser um dos principais contribuintes para imunopatogênese da COVID-19, e exerce um papel importante na desregulação da resposta imune e na síndrome hiperinflamatória (WALTER et al., 2022a). Estudos que avaliaram o compartimento dos monócitos em pacientes

graves observaram disfuncionalidade nos monócitos circulantes, com diminuição da expressão de HLA-DR e CD40, além de um perfil de citocinas alterado (JEANNET et al., 2020; MANN et al., 2020). Além disso, em um estudo recente, foi demonstrado que os pacientes com quadro clínico de moderado a crítico apresentam redução expressiva nos valores absolutos e relativos das células dendríticas, e uma relação pDC (células dendríticas plasmocitóides)/cDC (células dendríticas clássicas) diminuída, o que indica alterações no compartimento das células dendríticas (WALTER et al., 2022a).

Dessa forma, a progressão da COVID-19 resulta de uma interação de múltiplos mecanismos fisiopatológicos, de modo que a resposta imune à infecção pelo SARS-CoV 2 é determinante no curso da doença. A desregulação das respostas imunes inatas e adaptativas, juntamente com outros fatores individuais de cada hospedeiro, são determinantes na progressão para a doença grave (VAN EIJK et al., 2021).

## 2.6 COVID-19 E CÂNCER

Os pacientes com câncer apresentam maior suscetibilidade a infecções virais, devido ao quadro de imunossupressão ocasionado pelo tumor ou pelo tratamento oncológico (KHOURY et al., 2022; LIANG et al., 2020). Já foi observado, em outras infecções virais, como na infecção pelo vírus Influenza, que pacientes com tumores sólidos e hematológicos apresentam um aumento da taxa de mortalidade (KHOURY et al., 2022). Desde o surgimento da pandemia, vários estudos destacaram os pacientes com câncer como parte de um grupo mais suscetível à infecção pelo SARS-CoV-2 e com maior probabilidade de evoluir para desfechos graves (KHOURY et al., 2022; KUDERER et al., 2020; LIANG et al., 2020; LIU, W. et al., 2020; ROBILOTTI et al., 2020). Diversos estudos encontraram alta prevalência de internação hospitalar e necessidade de suporte ventilatório, assim como, taxas substancialmente altas de mortalidade nos pacientes com câncer e infecção pelo SARS-CoV-2. As taxas de mortalidade nesse grupo de pacientes variaram entre 12% a 28% (KUDERER et al., 2020; LEE et al., 2020; MEHTA et al., 2020; ROBILOTTI et al., 2020). Em uma recente meta-análise, que incluiu 56.932 pacientes com câncer e COVID-19, 12% (6.813) dos pacientes evoluíram a óbito, as medianas do tempo de acompanhamento variaram de cinco a sessenta e nove dias (KHOURY et al., 2022).

No decorrer da pandemia da COVID-19, os pacientes oncológicos foram gravemente afetados. Não somente pela suscetibilidade à infecção e por apresentarem pior prognóstico, mas também pelo impacto ocasionado na assistência à saúde e no tratamento do câncer (BAKOUNY

et al., 2020; LATIF et al., 2022). Os pacientes com neoplasias malignas geralmente apresentam comorbidades subjacentes e idade avançada, o que aumenta o risco de desenvolver as formas mais graves da COVID-19 (KUDERER et al., 2020). Além disso, nesse grupo de pacientes, a evolução da COVID-19 pode apresentar diferentes desfechos clínicos devido a heterogeneidade dessa população, que apresenta diferentes mecanismos de desregulação imune (LATIF et al., 2022). Nos pacientes oncológicos, a resposta imune pode ser suprimida ou exacerbada (BAKOUNY et al., 2020). A imunossupressão pode ser decorrente dos efeitos da própria malignidade, assim como, do tratamento antineoplásico ou das terapias de suporte. Em contrapartida, alguns pacientes com câncer podem apresentar uma resposta imune exacerbada à infecção, devido ao uso de drogas imunomoduladoras (KUDERER et al., 2020).

Sabe-se que pacientes com tumores hematológicos têm um sistema imune profundamente debilitado e apresentam alto risco de contrair infecções (GASMI et al., 2021). Numerosos estudos relataram que os pacientes com neoplasia hematológica apresentam risco elevado de evoluir para as formas mais graves da COVID-19 (BASSE et al., 2021; GRIVAS et al., 2021; KHOURY et al., 2022; LEE et al., 2020; PASSAMONTI et al., 2020; SHAH et al., 2020; SHARAFELDIN et al., 2021). Além dos pacientes com câncer hematológico, estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes com câncer de pulmão ou mama também apresentam maior risco de hospitalização e óbito em decorrência da infecção pelo SARS-CoV-2 (LUO et al., 2020; RUGGE; ZORZI; GUZZINATI, 2020; VIJENTHIRA et al., 2020). A imunopatologia dessas três malignidades é muito distinta, o que indica que no decorrer da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, esses pacientes provavelmente apresentarão diferentes alterações no sistema imune (LATIF et al., 2022).

Ainda, devido ao risco de desregulação do sistema imune nos pacientes com câncer, esses pacientes podem não ser capazes de apresentar uma resposta imune protetora à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 ou à vacinação (SUN; WARNER; PARIKH, 2021). Vários estudos demonstraram que os pacientes com tumores hematológicos têm maior risco de desencadear respostas imunes reduzidas à vacinação contra o vírus SARS-CoV-2 (ADDEO et al., 2021; EHMSSEN et al., 2021; FENDLER et al., 2021; FENDLER et al., 2022; MAIR et al., 2022; MONIN et al., 2021; PEETERS et al., 2021; THAKKAR et al., 2021), o que é de extrema preocupação, visto que a vacinação é, atualmente, a principal ferramenta para a prevenção e proteção contra a COVID-19 (FERNANDES et al., 2022).

Assim, é essencial compreender o desenvolvimento da COVID-19 e os fatores que determinam um pior prognóstico nos pacientes com neoplasias malignas, visto a alta prevalência de pacientes que são afetados mundialmente pelo câncer, devido à alta

transmissibilidade do SARS-CoV-2 e a incidência de desfechos graves nesse grupo de pacientes (KUDERER et al., 2020). As razões para alta incidência de indivíduos com COVID-19 nesse subgrupo podem estar associadas a fatores biológicos e imunológicos (BAKOUNY et al., 2020). Dessa maneira, avaliar o perfil imune nesse grupo de pacientes, possibilita a identificação precocemente dos pacientes que podem evoluir para um quadro clínico crítico, o que é imprescindível, visto a maior suscetibilidade à infecção e maior risco de complicações e óbito em decorrência da COVID-19 nos pacientes com câncer.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune em pacientes com neoplasias malignas infectados pelo vírus SARS-CoV-2, por meio da análise do comportamento das células do sistema imune circulantes, dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, das citocinas plasmáticas e dos mediadores inflamatórios, para identificação de biomarcadores de prognóstico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em pacientes oncológicos e não oncológicos, infectados pelo SARS-CoV-2, e, em controles saudáveis, os parâmetros descritos abaixo:

- As frequências absolutas e relativas de populações celulares circulantes em sangue periférico, tais como subtipos de células T, B, células natural killers (NK), células dendríticas (DCs), monócitos e neutrófilos;
- A concentração de citocinas plasmáticas incluindo: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-17A, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ;
- As concentrações dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG no plasma;
- As concentrações de óxido nítrico (NO) e atividade da mieloperoxidase (MPO) plasmáticas;

- Investigar a correlação entre as populações de células circulantes, a concentração de citocinas plasmáticas e a concentração de anticorpos específicos, assim como dos mediadores inflamatórios, como possíveis marcadores da evolução e gravidade da COVID-19 em pacientes com câncer.

- Investigar a correlação entre as células imunes circulantes, a concentração de citocinas plasmáticas e a concentração de anticorpos específicos, assim como dos mediadores inflamatórios, em pacientes com câncer e comparar com os pacientes sem neoplasias malignas infectados pelo vírus SARS-CoV-2 e com indivíduos saudáveis, a fim de verificar associação dessas variáveis com o desfecho clínico nesses pacientes.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo caso-controle prospectivo.

### 4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRAGEM

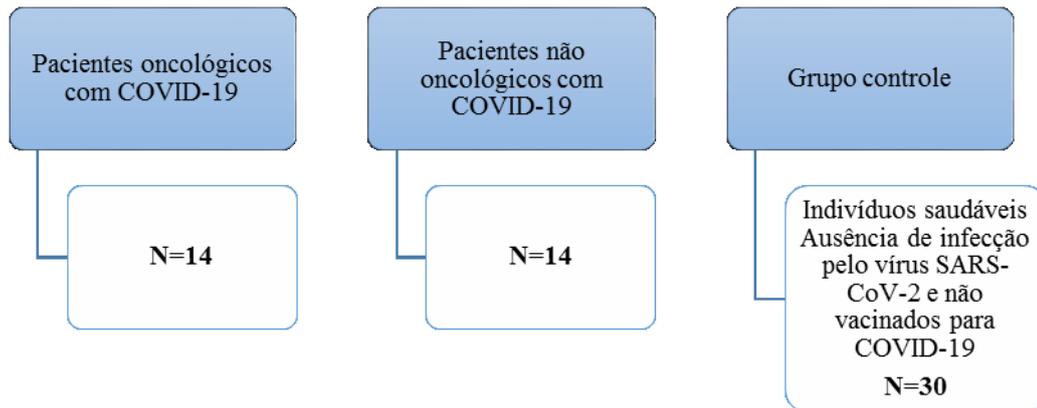
Neste estudo foram incluídos 28 pacientes com diagnóstico de COVID-19 que foram subdivididos entre os grupos: 14 pacientes oncológicos e 14 pacientes não oncológicos. Como grupo controle foram incluídos 30 indivíduos saudáveis. É importante ressaltar que os pacientes com COVID-19 incluídos no estudo não tinham sido vacinados para a COVID-19. A distribuição dos grupos está descrita na Figura 3. As amostras foram coletadas de agosto de 2020 até maio de 2022. Os pacientes com COVID-19 incluídos no estudo foram atendidos em dois hospitais de alta complexidade localizados no município de Florianópolis-SC, Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC-EBSERH) e Hospital Nereu Ramos, onde estavam em acompanhamento ambulatorial ou internados. Para a confirmação do diagnóstico de COVID-19 foram considerados os testes de antígeno ou teste de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR).

Dos 14 pacientes oncológicos incluídos no estudo, sete tinham diagnóstico de tumores sólidos e sete hematológicos. Os pacientes sem neoplasias malignas e com diagnóstico de COVID-19, foram selecionados de acordo com os mesmos critérios já descritos, pareados quanto ao sexo e idades similares aos pacientes do grupo oncológico. Foram considerados como critérios de exclusão: pacientes menores de 18 anos, gestantes, puérperas e indivíduos soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os critérios de exclusão para os pacientes do grupo controle incluíram ainda: histórico de neoplasia, diabetes mellitus, doença autoimune, doença inflamatória crônica, consumo excessivo de álcool e infecções nos últimos sete dias.

A coleta de dados demográficos, idade, sexo, sintomas e comorbidades foi realizada por meio da consulta de prontuário e para os pacientes não internados foi aplicado um questionário previamente descrito por Walter (2022b) (Apêndice D). Os pacientes de cada grupo foram estratificados conforme a gravidade da COVID-19 em: leve, moderado, severo e crítico, de acordo com as diretrizes divulgadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2021). Todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFSC, com número de parecer 4.004.972 (CAAE: 31124820.1.0000.0121).

Figura 3 – Casuística.



#### 4.3 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise do perfil imune dos pacientes, foram coletados dois tubos de sangue total de 4ml com anticoagulante EDTA/K3. As amostras destinadas à imunofenotipagem foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento do processamento, que não excedeu o período de 24 h. O primeiro tubo de sangue total com EDTA/K3 foi utilizado para marcação das células do sistema imune por citometria de fluxo. O segundo tubo foi submetido à centrifugação e separação do plasma, seguido pelo congelamento dessas amostras a  $-80^{\circ}\text{C}$ , que, posteriormente, foi utilizado para dosagem das citocinas plasmáticas, atividade da mieloperoxidase (MPO), dosagem da concentração de óxido nítrico (NO) e dosagem dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2.

Para a avaliação das células imunes foi utilizado o método de plataforma dupla, utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, EUA) com o *software* FACS Diva™ (BD Biosciences, EUA) para as contagens de valores relativos das células imunes e o analisador de células hematológicas BC-6200 (Mindray, China) para contagens de valores absolutos. Os valores relativos das células analisadas por citometria de fluxo foram multiplicados pelas contagens absolutas obtidas pelo contador hematológico, e, dessa forma, o valor absoluto de

cada subpopulação celular foi determinado. Vale ressaltar, que ambos os equipamentos têm sua eficiência avaliada diariamente por controles de qualidade internos.

#### 4.3.1 Painel de anticorpos monoclonais

Para a avaliação imunofenotípica das células sanguíneas por citometria de fluxo foi utilizado um painel de oito cores, conforme descrito por Cardoso e Santos-Silva (2019). Quadro 1.

Quadro 1 – Painel de anticorpos monoclonais.

	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PECy7	APC	APC-H7	PacB	PacO
<b>Tubo 1</b>	CD8	CD56	CD5	CD19/GD	CD3	CD38	CD20/CD4	CD45
<b>Tubo 2</b>	CD62L	CCR7	CD4	CD45RA	CD3	CD8	HLA-DR	CD45
<b>Tubo 3</b>	CD57	CD28	CD4	CD45RA	CD3	CD8	HLA-DR	CD45
<b>Tubo 4</b>	CD127	CD25	CD4	CD45RA	FoxP3	CD8	CD3	CD45
<b>Tubo 5</b>	IgD	CD24	CD27	CD19	IgM	CD38	CD20	CD45
<b>Tubo 6</b>	CD16	CD123	CD11c	CD10	CD14	CD3/CD19/CD20	HLA-DR	CD45

APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: Pacific Blue/V450; PacO: Pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PECy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5–5: peridinina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte: Adaptado de CARDOSO; SANTOS-SILVA, 2019.

#### 4.3.2 Protocolos de marcação

A marcação das amostras foi realizada conforme descrito anteriormente por Cardoso e Santos-Silva (2019). O Tubo 1 foi destinado à avaliação do perfil leucocitário da amostra. Os Tubos 2, 3 e 4 foram atribuídos para avaliação dos linfócitos T. O Tubo 5 foi destinado à análise dos linfócitos B, enquanto que o Tubo 6 foi utilizado para a avaliação dos monócitos e das células dendríticas. Para realizar a marcação dos Tubos 1, 2, 3 e 6, foram pipetados, em um tubo de poliestireno de 5 mL, o volume de 200 a 300  $\mu$ L de sangue total com EDTA/K3 e, posteriormente, foram pipetados os volumes apropriados dos anticorpos monoclonais conforme titulação prévia. Os tubos foram homogeneizados por vórtex, e, posteriormente, incubados por

30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Após a adição de 2 mL de solução lisante de hemácias previamente diluída 10x (Beckton Dickinson, EUA), as amostras foram novamente incubadas durante 15 minutos. Decorrido o período de incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 rpm. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salina, do inglês *Phosphate-buffered saline*), e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de leucócitos foi ressuscitado com 300 µL de PBS para serem adquiridos imediatamente no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, EUA) com o *software* FACS Diva™ (BD Biosciences, EUA).

O Tubo 4, atribuído para análise dos linfócitos T reguladores (Treg), requer outro processo de marcação. Esse tubo necessita de marcação intracitoplasmática, que foi realizada utilizando um tampão específico para fator de transcrição (*Transcription Factor Buffer Set*, Beckton Dickinson, EUA). Inicialmente foram pipetados de 200 a 300 µL de sangue total com EDTA/K3, e, posteriormente, foram pipetados os anticorpos monoclonais de superfície. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados por 30 minutos em geladeira e na ausência de luz. Após o período de incubação, a amostra foi lavada com 1 mL de PBS frio. Após remover o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL da solução *Fix/Perm Buffer*, seguido pela incubação em geladeira durante 40 minutos. Decorrido o período de incubação, a amostra foi lavada duas vezes com a solução *Perm/Wash* e, posteriormente, a amostra foi marcada com o anticorpo monoclonal FoxP3, seguida pela incubação em geladeira pelo período de 40 minutos. Após a incubação, as amostras foram lavadas com a solução *Perm/Wash* duas vezes antes de serem adquiridas imediatamente no citômetro de fluxo.

O Tubo 5 foi destinado à análise das células B. Com o intuito de concentrar mais linfócitos B, utilizou-se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) que foram separadas com auxílio do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque de acordo com procedimentos previamente estabelecidos (COSSARIZZA et al., 2019). Em um tubo de poliestireno de 5 mL, foram pipetados 2 mL da solução Ficoll-Hypaque. Em outro tubo foram misturados 1,5 mL de sangue total a 0,5 mL de PBS. Essa suspensão foi adicionada com auxílio de uma pipeta *Pasteur* sobre a solução do Ficoll-Hypaque, sem que eles se misturassem. Em seguida, o tubo foi centrifugado durante 30 minutos a 2.000 rpm. Após a centrifugação, a camada superior foi removida, desse modo foi coletado somente a “nuvem” que contém as PBMCs e transferido para um outro tubo. Nesse tubo contendo a “nuvem” de PBMC, foi adicionado 4 mL de PBS e, posteriormente, esse tubo foi centrifugado. O *pellet* obtido após a centrifugação foi submetido à marcação de superfície.

O Tubo considerado “branco” foi utilizado para todos os pacientes. Esse tubo não contém anticorpos monoclonais, e foi utilizado como um controle negativo. Para garantia de uma análise de qualidade, foram definidas quantidades ideais de células a serem adquiridas em cada tubo. No Tubo branco, sem marcação, foram adquiridos 10.000 eventos totais. No Tubo 1, foi avaliada a celularidade da amostra, e foram adquiridos 200.000 eventos totais. Nos Tubos 2, 3 e 4 foram adquiridos 100.000 eventos CD3 +. No Tubo 5, foram adquiridos 50.000 eventos CD19 +. No Tubo 6, para garantia de uma análise mais precisa das células dendríticas, foram adquiridos  $1 \times 10^6$  eventos CD45+. As amostras foram processadas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (Beckton Dickinson, EUA) de três lasers e na configuração de oito cores, acoplado com o *software* para aquisição de dados FACSDiva™ (Beckton Dickinson, EUA). Os dados adquiridos foram analisados pelo *software* Infinicyt™ 2.0 (Cytognos, Espanha).

#### 4.3.3 Análise da expressão de HLA-DR, CD62L e CD56

A análise da expressão de HLA-DR nos monócitos e seus subtipos (cMO, iMO, ncMO e TIMAS (iMO e ncMO juntos), foi realizada pela avaliação da intensidade de fluorescência média (IFM) do marcador HLA-DR. A expressão de CD62L e de CD56, foi avaliada pela porcentagem de células que expressam essas moléculas em sua superfície.

#### 4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS

Conforme visto anteriormente, para dosagem das citocinas foi utilizado o plasma previamente separado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O plasma de cada paciente foi descongelado para dar seguimento nos experimentos. Para análise das citocinas foi utilizado o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) (Beckton Dickinson, EUA) e o kit CBA Human Th1/Th2/Th17 (Beckton Dickinson, EUA), que permitiram a avaliação das seguintes citocinas: IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-4, IL-2, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A marcação foi realizada em conformidade com as instruções do fabricante. Para determinação das concentrações das citocinas pelo *software* do citômetro de fluxo, foi realizada uma curva padrão, com diluições desde 0 pg/mL a 5.000 pg/mL. O citômetro de fluxo utilizado para aquisição das amostras foi o FACSVerse™ (Beckton Dickinson, EUA) e a análise dos dados foi realizada pelo *software* FCAP Array™ (Beckton Dickinson, EUA).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG

Para a detecção dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 foram utilizados os kits Human Anti-2019 nCoV (N+S) IgM ELISA Kit e Human Anti-2019 nCoV (N+S) IgG ELISA Kit (FineTest, China), que utilizam a tecnologia de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto em placa de 96 poços. O procedimento de ensaio foi realizado de acordo com os protocolos do fabricante. Nos poços previamente identificados, foi adicionado 49  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição de amostra e 1  $\mu\text{L}$  de amostra. No poço “branco” foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição, e, nos poços previamente identificados como controle, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de controle negativo e 50  $\mu\text{L}$  de controle positivo. Posteriormente a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C, e, após o período de incubação, foi adicionado solução tampão para remoção de interferentes, esse procedimento foi realizado três vezes. Após esse processo, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho anti-IgG ou anti-IgM conjugada com HRP (do inglês *horseradish peroxidase*) em cada poço. A placa foi incubada novamente durante 30 minutos e foi adicionado novamente a solução tampão para remoção de interferentes. Após realizar esse procedimento cinco vezes, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de substrato TMB (tetrametilbenzidina, do inglês *tetramethylbenzidine*) em cada poço, seguido pela incubação a 37°C na ausência de luz durante 10 minutos. Após a incubação, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  da solução de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e a densidade ótica foi lida imediatamente no comprimento de onda de 450nm.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da mieloperoxidase foi determinada utilizando a metodologia detalhada por RAO et al. (1993). As amostras foram incubadas com meio de tampão (0,167 mg/mL de odianisidina 2HCl e 0,0005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durante 15 minutos à 37°C em microplaca de 96 poços. Após a adição de 15  $\mu\text{L}$  de azida ( $\text{NaN}_3$  1%), a placa foi incubada durante 10 minutos à 37°C e a reação enzimática foi interrompida. A mensuração da quantidade de MPO presente foi realizada com auxílio do leitor de placa de ELISA MB-580 (Heales, China) no comprimento de onda de 450 nm. Curvas-padrão com concentrações previamente conhecidas de mieloperoxidase (0,7–140 mU/mL) também foram determinadas por medições colorimétricas, para quantificação dos valores desconhecidos da mieloperoxidase em mU/mL.

#### 4.7 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO foi mensurada de maneira indireta pela análise de formação de seus metabólitos nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), pela reação de Griess (GREEN et al., 1982). Nesta reação, o cloreto de vanádio converte o nitrato em nitrito, e, a partir da adição do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1%), é produzida uma coloração rósea. Essa reação colorimétrica foi mensurada em leitor de microplaca ELISA MB-580 (Heales, China) no comprimento de onda de 540 nm. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (0–150 µM), também foram quantificadas a partir da sua densidade ótica, o que permitiu determinar os valores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em µM.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Análise de variância (ANOVA) com teste *post-hoc* de Bonferroni foi utilizada para comparar as variáveis quantitativas no caso de distribuição paramétrica. Para variáveis paramétricas não homogêneas foi utilizado o *post-hoc* de Games-Howell. As variáveis quantitativas não paramétricas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni, ou pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram analisadas através do teste de qui-quadrado. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para comparação das variáveis em relação ao desfecho (óbito/sobrevivência), foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas, e o teste de ANOVA para variáveis paramétricas, e os resultados que apresentaram diferença significativa foram submetidos à regressão logística binária. A análise estatística foi realizada através do *software* MedCalc versão 20.015 (Bélgica).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Até o momento, foram incluídos 58 pacientes no estudo. Desses, 28 pacientes com COVID-19, dos quais, 14 pacientes apresentavam diagnóstico de neoplasia maligna e 14 pacientes sem neoplasias malignas. Foram incluídos 30 pacientes como grupo controle. Os pacientes com COVID-19 foram estratificados conforme o quadro clínico da doença em: leve (n=14), moderado (n=4), severo (n=4) e crítico (n=6). Dos pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna, sete (50%) tinham tumores sólidos e sete (50%) tumores hematológicos. A mediana de idade do grupo controle foi de 54 anos (31 - 66 anos) e a predominância foi do sexo masculino (66%). Como pode ser observado na Tabela 1, a mediana de idade dos pacientes com neoplasia e diagnóstico de COVID-19 foi de 54 anos (18 – 77 anos), com distribuição igual entre os sexos, sete (50%) do sexo feminino e sete (50%) do sexo masculino. Os pacientes com COVID-19 não oncológicos, foram pareados com os pacientes do grupo de neoplasias malignas nas variáveis: sexo, quadro clínico e idade.

No grupo de pacientes com COVID-19 sem neoplasias, as comorbidades mais prevalentes foram: hipertensão arterial (em 42,9% dos pacientes), obesidade (em 35,7% dos pacientes) e diabetes mellitus (em 28,6% dos pacientes). Já no grupo de pacientes com COVID-19 e neoplasias, as comorbidades mais prevalentes foram: hipertensão arterial (em 21,4% dos pacientes), tabagismo (em 21,4% dos pacientes) e doença pulmonar (em 21,4% dos pacientes) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos pacientes.

(Continua)

Variável	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	p
<b>Sexo</b>			
Feminino, n (%)	7 (50%)	7 (50%)	1,00
Masculino n (%)	7 (50%)	7 (50%)	1,00
<b>Idade</b>	54,00 (18,00 – 77,00)	54,00 (27,00 – 72,00)	0,863
<b>Comorbidades</b>			
Hipertensão arterial, n (%)	3 (21,4%)	6 (42,9%)	0,225
Diabetes mellitus, n (%)	1 (7,1%)	4 (28,6%)	0,139
Obesidade (IMC $\geq$ 30kg/m <sup>2</sup> ), n (%)	1 (7,1%)	5 (35,7%)	0,065
Doença autoimune, n (%)	0	1 (7,1%)	0,309
Doença renal, n (%)	0	1 (7,1%)	0,309
Cardiopatia, n (%)	0	3 (21,4%)	0,067
Etilismo, n (%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)	1,00
Tabagismo, n (%)	3 (21,4%)	0	0,067

Tabela 1 – Características dos pacientes.

(Conclusão)

Variável	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
Doença pulmonar, n (%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)	0,280
Complicação cardiovascular prévia, n (%)	0	1 (7,1%)	0,309
Outros, n (%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)	0,622

O teste de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foram utilizados para análise das variáveis não paramétricas. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado.  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

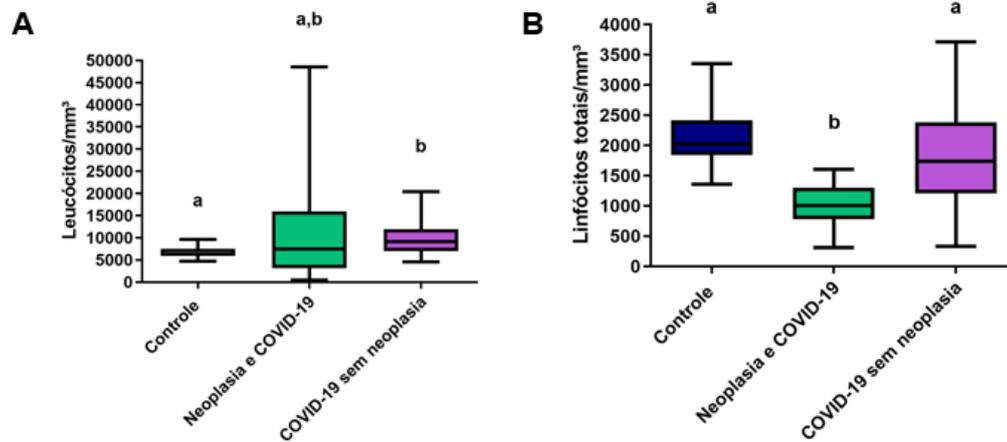
## 5.2 ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNES CIRCULANTES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Informações completas da análise das células imunes circulantes no sangue periférico estão descritas no Apêndice A.

### 5.2.1 Celularidade Total

Quando avaliada a contagem absoluta de leucócitos, os pacientes com COVID-19 não oncológicos apresentaram aumento de leucócitos totais em relação ao controle ( $p=0,037$ ), mas não apresentaram diferença significativa em relação aos pacientes com neoplasia e COVID-19. Os pacientes com neoplasia não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle (Figura 4A). Em relação à contagem de linfócitos totais, os pacientes com neoplasia e COVID-19 apresentaram diminuição na contagem absoluta de linfócitos quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) e ao grupo sem neoplasia ( $p=0,001$ ). Já o grupo de pacientes sem neoplasias não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 4B).

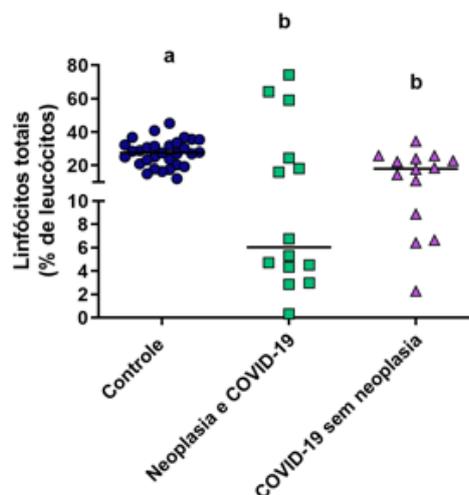
Figura 4 – Contagem absoluta de leucócitos e linfócitos totais no sangue periférico.



Valores absolutos de leucócitos (A) e valores absolutos de linfócitos totais (B) em sangue periférico por citometria de fluxo. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni para os valores absolutos de leucócitos e para os valores absolutos de linfócitos totais foi utilizado o teste ANOVA e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ) (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana.

Uma diminuição dos valores relativos de linfócitos totais também foi observada nos pacientes com COVID-19, do grupo oncológico e não oncológico, quando comparados ao grupo controle ( $p= 0,002$ , Figura 5).

Figura 5 – Contagem relativa de linfócitos totais no sangue periférico.

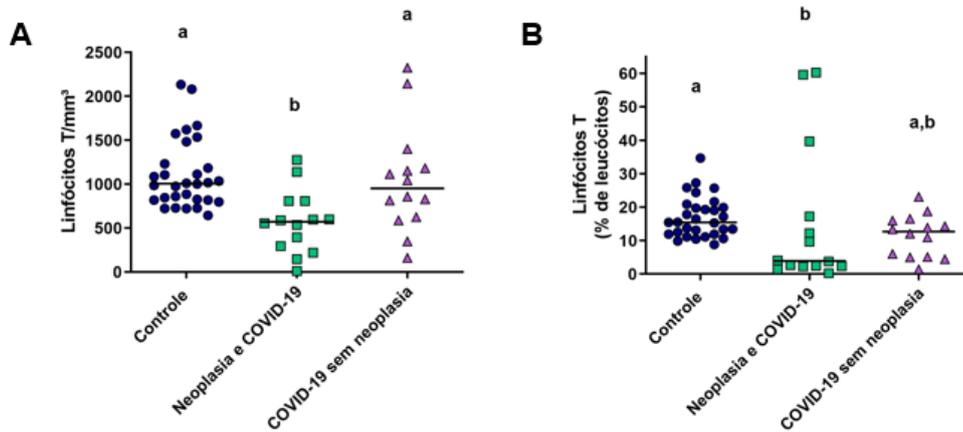


Valores relativos de linfócitos totais em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de

Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**).

Em relação aos linfócitos T, foi possível observar uma redução expressiva na contagem absoluta de linfócitos T quando comparado o grupo oncológico com o grupo controle ( $p < 0,001$ , Figura 6A) e com o grupo não oncológico ( $p = 0,022$ , Figura 6A). Os valores relativos de linfócitos T também reduziram significativamente nos pacientes oncológicos em relação ao controle ( $p = 0,026$ , Figura 6B).

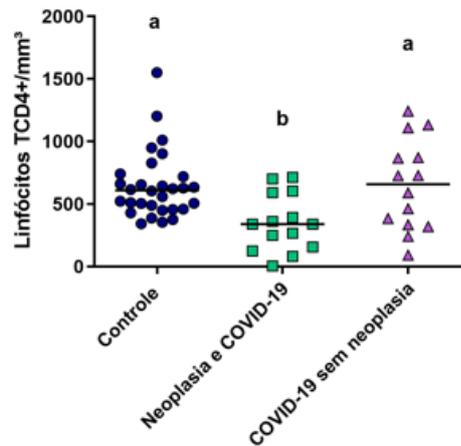
Figura 6 – Contagem absoluta e relativa de linfócitos T no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos T em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. O teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foram utilizados para avaliar as diferenças e valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si. (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Ao avaliar os subtipos de linfócitos T, foi observada uma expressiva diminuição da contagem absoluta de linfócitos T  $CD4^+$  nos pacientes com neoplasia em relação ao grupo controle ( $p = 0,005$ ) e em relação ao grupo não oncológico ( $p = 0,039$ ), conforme Figura 7. Não houve diferença significativa quando comparado o grupo de pacientes não oncológicos com o grupo controle. Em relação aos valores relativos de linfócitos T  $CD4^+$ , não houve diferença significativa entre os grupos comparados (Apêndice A).

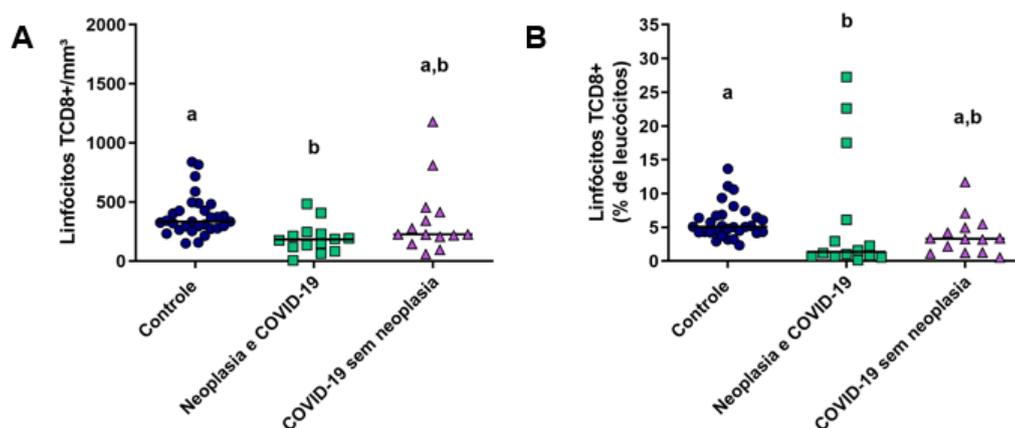
Figura 7 – Contagem absoluta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no sangue periférico.



Valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. O teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foram utilizados para avaliar as diferenças e valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si. (**a** é estatisticamente diferente de **b**).

Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os pacientes oncológicos apresentaram redução da contagem absoluta ( $p < 0,001$ , Figura 8A) e relativa ( $p = 0,014$ , Figura 8B) quando comparados ao grupo controle. Os pacientes sem neoplasia não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle e ao grupo oncológico.

Figura 8 – Contagem absoluta e relativa de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. O teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foram utilizados para avaliar as diferenças e valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si. (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

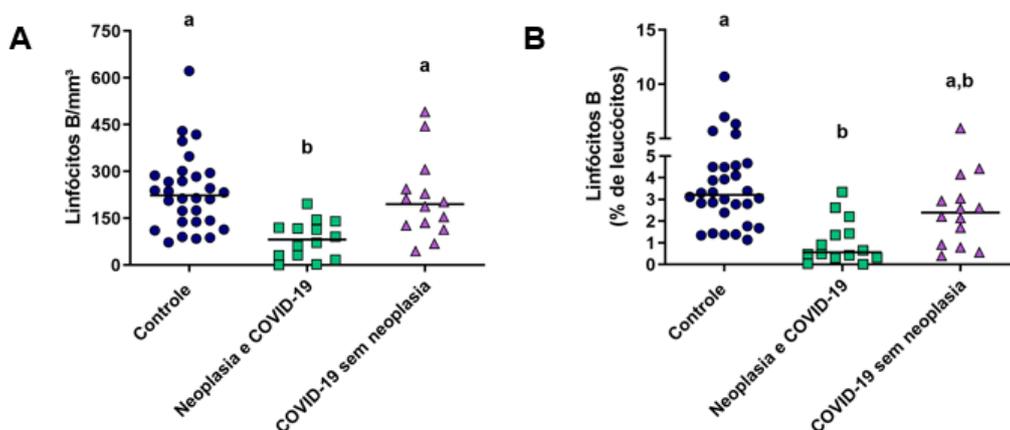
Em relação aos linfócitos T gama delta (GD), os pacientes com COVID-19 se comportaram de maneira semelhante. Quando comparados com o grupo controle, os pacientes oncológicos e não oncológicos, apresentaram diminuição da contagem relativa ( $p < 0,001$ ) e absoluta ( $p < 0,001$ ) de linfócitos T GD (Apêndice A).

Os pacientes oncológicos também apresentaram diminuição da contagem relativa ( $p = 0,015$ ) e absoluta ( $p = 0,001$ ) de linfócitos T DP ( $CD4^+ CD8^+$ ), quando comparados ao grupo controle. Os pacientes do grupo sem neoplasia com COVID-19 não apresentaram diferença significativa quando comparado aos demais grupos (Apêndice A).

Também foi observada uma redução da contagem relativa de linfócitos T DN ( $CD4^- CD8^-$ ) nos pacientes oncológicos em relação aos pacientes do grupo controle ( $p = 0,029$ ), e, essa redução também foi observada na contagem absoluta de linfócitos T DN nos pacientes oncológicos, tanto em relação ao controle ( $p = 0,002$ ), quanto em relação ao grupo não oncológico ( $p = 0,001$ ). Os pacientes sem neoplasias com COVID-19 não apresentaram diferença significativa na contagem absoluta e relativa quando comparados ao grupo controle (Apêndice A).

Os pacientes oncológicos também apresentaram redução significativa tanto na contagem absoluta, quanto na contagem relativa de linfócitos B, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ , Figura 9A e 9B). O grupo oncológico também apresentou valores absolutos mais reduzidos de linfócitos B quando comparado ao grupo de pacientes sem neoplasias com COVID-19 ( $p = 0,010$ , Figura 9A).

Figura 9 – Contagem absoluta e relativa de linfócitos B no sangue periférico.



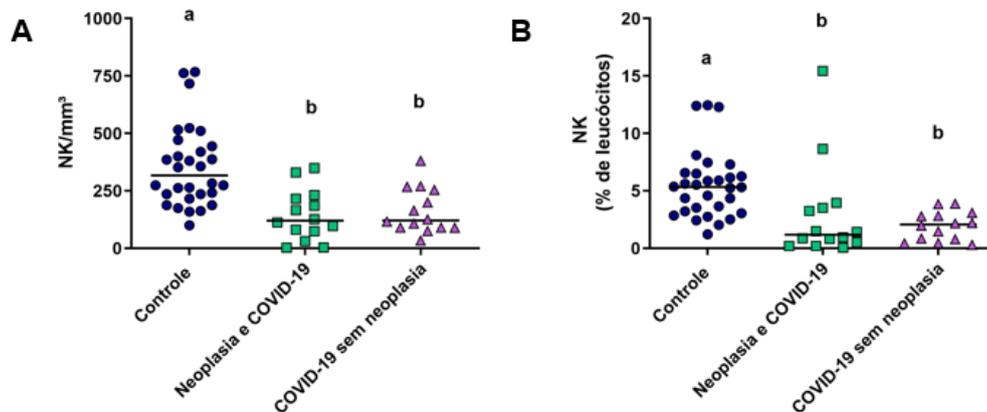
Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos B em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. O teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foram utilizados para avaliar as diferenças e valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si. (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Ao avaliar os linfócitos B nos pacientes oncológicos, a contagem absoluta e relativa de linfócitos B maduros demonstrou-se expressivamente reduzida tanto em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ), quanto em relação ao grupo não oncológico ( $p = 0,008$  e  $p = 0,037$ , respectivamente). O grupo sem neoplasia com COVID-19 não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Apêndice A).

Em relação às células NK, quando comparados ao grupo controle, os pacientes oncológicos apresentaram redução da contagem absoluta ( $p < 0,001$ , Figura 10A) e relativa ( $p = 0,002$ , Figura 10B). Essa redução também foi observada nos pacientes não oncológicos na contagem relativa ( $p < 0,001$ , Figura 10B) e absoluta ( $p = 0,001$ , Figura 10A), quando comparados ao controle. Entre os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, não houve diferença significativa nos valores relativos e absolutos das células NK.

Figura 10 – Contagem absoluta e relativa de células NK no sangue periférico.



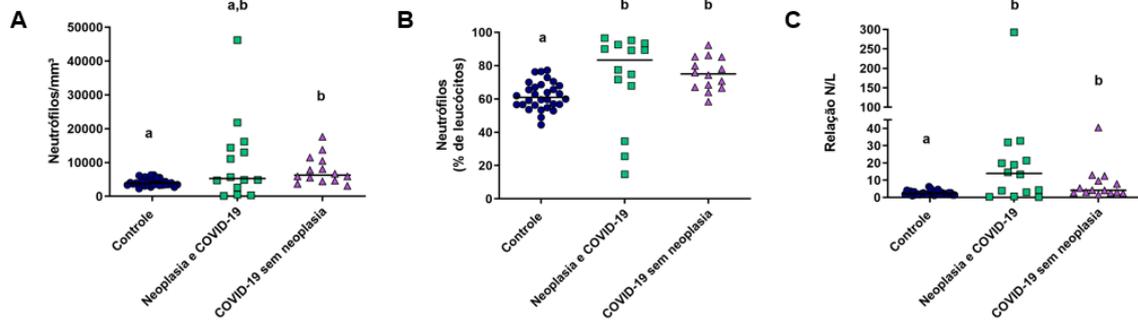
Valores absolutos (A) e relativos (B) de células NK (*Natural Killer*) em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**).

A linfopenia é uma característica bem definida na infecção pelo vírus SARS-CoV-2, embora os fatores desencadeantes ainda não estejam totalmente compreendidos. A redução de linfócitos T e B pode ser decorrente da morte celular e/ou do intenso recrutamento dessas células para os sítios inflamatórios (MANN et al., 2020). Outros estudos publicados

recentemente encontraram resultados semelhantes em pacientes oncológicos. Cai e colaboradores (2021) ao avaliarem alterações imunes em pacientes com câncer infectados pelo vírus SARS-CoV-2 e compararem com pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 sem câncer, observaram um declínio mais acentuado na contagem de linfócitos totais, incluindo linfócitos T totais, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e linfócitos B, nos pacientes oncológicos em comparação com os pacientes não oncológicos. Além disso, os autores observaram que a proporção de células T helper/células T supressoras permaneceu menor nos pacientes com câncer. Outro estudo conduzido por Kalicińska e colaboradores (2021) analisou subconjuntos de linfócitos em pacientes com COVID-19 e neoplasias hematológicas, e revelou que, além da redução de linfócitos T e NK, há uma depleção dos linfócitos T GD. Zhang e colaboradores (2021) descreveram ainda, que pacientes com câncer com mais células B e células T helper (Th) tiveram maior tempo de sobrevivência do que aqueles com menos células B e células Th. Martín-Sánchez e colaboradores (2021) evidenciaram também uma associação da contagem de células B em pacientes com COVID-19 e a sobrevivência, observaram que pacientes com menos de 1% de células B tiveram um risco 17 vezes maior de morte em relação àqueles com  $\geq 1\%$  de células B.

No tubo para avaliação da celularidade total, também foram analisados os granulócitos circulantes em sangue periférico. Em relação à análise dos granulócitos nos pacientes com COVID-19, quando comparados ao grupo controle, foi possível observar um aumento na contagem relativa de neutrófilos, tanto nos pacientes com neoplasia ( $p=0,004$ , Figura 11B), quanto nos pacientes não oncológicos ( $p= 0,005$ , Figura 11B). Em relação aos valores absolutos, somente o grupo não oncológico apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle ( $p= 0,007$ , Figura 11A). Também foi evidenciado um aumento na relação N/L nos pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, em relação ao grupo controle ( $p= 0,005$  e  $p= 0,016$ , respectivamente. Figura 11C). A mediana da relação N/L dos pacientes oncológicos com COVID-19 foi seis vezes maior do que dos indivíduos saudáveis ( $M_d:13,91$  e  $M_d: 2,21$ , respectivamente).

Figura 11 – Contagem absoluta e relativa de neutrófilos no sangue periférico e relação N/L.



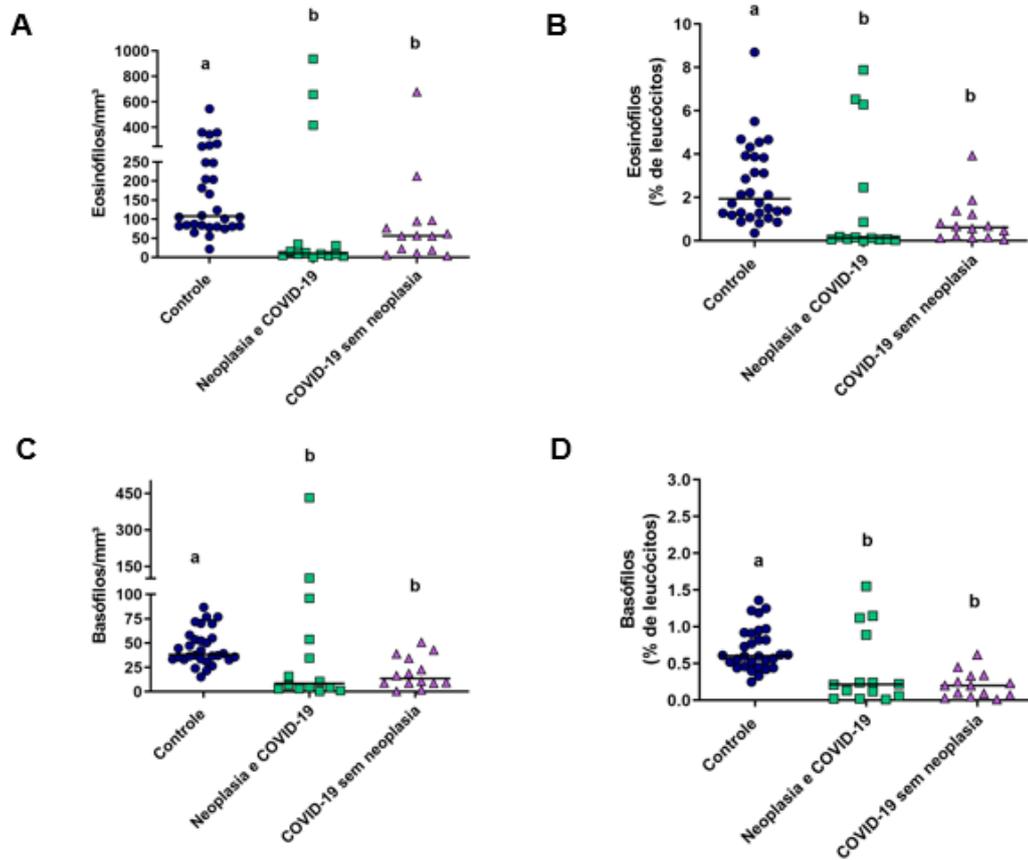
Valores absolutos (A) e relativos (B) de neutrófilos em sangue periférico por citometria de fluxo. Em (C) relação N/L. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

A relação neutrófilo-linfócito (N/L) tem sido sugerida como um biomarcador prognóstico de gravidade em diversas doenças inflamatórias crônicas, incluindo o câncer (JIMENO et al., 2020). Sabe-se que a inflamação contribui na progressão da doença oncológica e a alta relação N/L tem sido sugerida como um biomarcador de gravidade em várias malignidades (CUPP et al., 2020; TEMPLETON et al., 2021). Além disso, a relação N/L aumentada tem sido correlacionada com quadros mais graves e estágios mais avançados de câncer (JIMENO et al., 2020). Na COVID-19, também foi demonstrado que o aumento da relação N/L é considerado um fator independente de pior prognóstico (HAZELDINE; LORD, 2021; LIU, Yuwei, et al., 2020).

Nesse estudo, os pacientes oncológicos apresentaram um aumento da proporção de neutrófilos em sangue periférico, evidenciado pelo aumento da contagem relativa. Entretanto, na contagem absoluta de neutrófilos, os pacientes oncológicos não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o aumento da relação N/L nos pacientes oncológicos, se deu principalmente às custas da linfopenia que foi mais pronunciada nesse grupo de pacientes.

Ao analisar os eosinófilos e basófilos, foi possível identificar que os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, se comportaram de maneira semelhante quando comparados ao grupo controle, ao apresentar redução dos valores relativos ( $p= 0,001$ ) e absolutos ( $p= 0,001$ ) dos eosinófilos (Figura 12A e 12B), e, dos valores relativos ( $p<0,001$ ) e absolutos dos basófilos ( $p= 0,001$ ) (Figura 12C e 12D).

Figura 12 – Contagem absoluta e relativa de eosinófilos e basófilos no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de eosinófilos em sangue periférico por citometria de fluxo. Valores absolutos (C) e relativos (D) de basófilos em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (a é diferente estatisticamente de b).

Em relação aos valores de eosinófilos e de basófilos, Lourda e colaboradores (2021) evidenciaram uma redução substancial de eosinófilos e basófilos no sangue periférico de pacientes com COVID-19, a qual pode ser explicada pelo recrutamento dessas populações celulares para os tecidos inflamados, em particular para o pulmão, ou ainda, pode ser o resultado da reprogramação do precursor de granulócitos na medula óssea durante a hematopoiese de emergência, nos casos em que se observa neutrofilia acentuada.

### 5.2.2 Análise dos linfócitos T – Maturação

Os linfócitos T foram avaliados de acordo com o seu grau de maturação e subdivididos de acordo com o fenótipo, em: linfócitos TN (naive: CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>neg</sup> CD62L<sup>+</sup>), CM (memória central: CD45RA<sup>neg</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>), EM (efetor de memória: CD45RA<sup>neg</sup> CCR7<sup>neg</sup> CD27<sup>neg</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD62L<sup>neg</sup>), e EMRA (efetor terminal CD45RA<sup>+</sup>: CCR7<sup>neg</sup> CD27<sup>neg</sup> CD45RO<sup>neg</sup> CD62L<sup>neg</sup> CD45RA<sup>+</sup>).

Os linfócitos TN compreendem as células T que ainda não entraram em contato com um antígeno e que recém deixaram o timo. Após serem expostas a um estímulo antigênico, essas células assumem um fenótipo com baixa capacidade efetora, mas com alta capacidade de gerar novas células T efetoras, que são os linfócitos T CM. Os linfócitos T EM, são linfócitos que perderam a expressão das moléculas CD62L e CCR7, e têm como característica a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Já os linfócitos T EMRA que voltam a expressar CD45RA, possuem uma alta capacidade citotóxica, apesar de não possuir capacidade de expansão (CARDOSO, 2020; WALTER, 2022b).

Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, os pacientes oncológicos apresentaram redução dos valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> N (p= 0,005), T CD4<sup>+</sup> CM (p<0,001) e T CD4<sup>+</sup> EM (p=0,001), em comparação com os indivíduos saudáveis. Os pacientes com COVID-19 sem neoplasias, apresentaram aumento da porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> EMRA, dentro do compartimento dos linfócitos, quando comparados ao grupo controle (p= 0,041). Na análise dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, apresentaram redução dos valores absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> N (p=0,004 e p=0,025, respectivamente) e T CD8<sup>+</sup> CM (p=0,001 e p=0,010, respectivamente), em comparação com o grupo controle. Os pacientes oncológicos também apresentaram redução dos valores absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> EM e T CD8<sup>+</sup> EMRA, em comparação com os indivíduos saudáveis (p=0,001 e p=0,005 respectivamente). A análise da maturação dos linfócitos T está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Maturação dos linfócitos T.

(continua)

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
TCD4 N (%TCD4+)	28,60 (17,29 – 55,34)	33,39 (3,73 – 91,31)	25,66 (1,31 – 36,31)	0,098
TCD4 N/mm <sup>3</sup>	203,61 (86,77 – 465,64) <b>a</b>	91,88 (0,69 – 651,12) <b>b</b>	144,01 (3,15 – 303,22) <b>a,b</b>	0,004

Tabela 2 - Maturação dos linfócitos T.

(conclusão)

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
TCD4 CM (%TCD4+)	40,03 (17,48 – 57,09)	35,59 (0,14 – 48,98)	37,07 (3,55 – 64,26)	0,244
TCD4 CM/mm3	276,14 (141,30 – 485,48) <b>a</b>	95,93 (0,99 – 304,91) <b>b</b>	200,96 (8,54 – 798,89) <b>a,b</b>	<0,001
TCD4 EM (%TCD4+)	26,59 (14,05 – 55,75)	24,07 (0,08 – 52,10)	26,61 (16,13 – 68,49)	0,502
TCD4 EM/mm3	173,48 (76,18 – 893,84) <b>a</b>	59,75 (0,57 – 353,79) <b>b</b>	173,46 (21,07 – 305,20) <b>a</b>	0,001
TCD4 EMRA (%TCD4+)	3,75 (0,66 – 17,42) <b>a</b>	8,01 (1,41 – 18,27) <b>a,b</b>	11,96 (0,51 – 34,15) <b>b</b>	0,032
TCD4 EMRA/mm3	26,73 (5,46 – 104,86)	16,77 (0,30 – 73,26)	60,25 (3,03 – 200,86)	0,069
TCD8 N (%TCD8+)	21,33 (8,73 – 48,78)	22,99 (4,02 – 64,14)	16,41 (4,29 – 34,82)	0,285
TCD8 N/mm3	84,57 (32,78 – 452,31) <b>a</b>	31,76 (0,62 – 135,98) <b>b</b>	44,69 (2,78 – 266,95) <b>b</b>	0,001
TCD8 CM (%TCD8+)	13,05 (4,37 – 33,17)	11,50 (0,20 – 37,71)	7,36 (2,29 – 27,61)	0,227
TCD8 CM/mm3	48,71 (15,01 – 208,94) <b>a</b>	14,62 (0,81 – 91,14) <b>b</b>	18,53 (3,25 – 197,57) <b>b</b>	<0,001
TCD8 EM (%TCD8+)	31,33 (8,60 – 61,15)	27,07 (0,04 – 55,91)	36,63 (11,28 – 66,09)	0,357
TCD8 EM/mm3	116,91 (29,54 – 340,18) <b>a</b>	33,18 (0,16 – 232,06) <b>b</b>	81,18 (24,40 – 450,38) <b>a,b</b>	0,001
TCD8 EMRA (%TCD8+)	30,60 (5,91 – 68,63)	35,33 (11,53 – 71,06)	37,63 (13,05 – 67,30)	0,512
TCD8 EMRA/mm3	127,51 (32,89 – 344,68) <b>a</b>	51,11 (1,19 – 289,55) <b>b</b>	94,19 (27,67 – 326,35) <b>a,b</b>	0,007

Análise da maturação dos linfócitos T por citometria de fluxo. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). N: naive; CM: memória central; EM: efector de memória; EMRA: efector terminal CD45RA+.

A redução observada nos valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> naive e de memória nos pacientes oncológicos sugere um comprometimento da produção na medula óssea ou um aumento da apoptose dessas células, o que reflete a diminuição dos linfócitos T observada. Os pacientes com COVID-19 sem neoplasias apresentaram aumento da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> EMRA dentro do compartimento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em comparação com o grupo controle, o mesmo não foi observado nos pacientes oncológicos. O aumento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> EM e EMRA foi observado em pacientes com quadro clínico leve de COVID-19, o que refletiu a diferenciação e ativação dessa população celular nesses pacientes (WALTER et al., 2022b). Esses resultados indicam que nos pacientes com COVID-19 do grupo

sem neoplasias, as células T estão mantendo a sua diferenciação, o que não foi observado nos pacientes oncológicos. Isso também pode ser explicado pela disfunção imune nos pacientes oncológicos, como a baixa expressão de HLA-DR nos monócitos e a redução de APCs, o que compromete a apresentação de antígenos aos linfócitos T e sua consequente ativação/diferenciação.

### 5.2.3 Análise dos linfócitos T – Ativação

A ativação dos linfócitos T foi avaliada pela expressão dos marcadores CD28, CD57 e HLA-DR. A molécula de superfície CD28 é expressa em todos os linfócitos TN. O sinal de ativação nos linfócitos T se dá inicialmente por meio da interação do receptor dos linfócitos T (TCR) com o MHC, e da coestimulação pelo receptor CD28 presente nos linfócitos T que interage com os receptores CD80 e CD86 presente na superfície das APCs (ACUTO; MICHEL, 2003; COLEMAN; ZIMMERLY; YANG, 2021; ESENSTEN et al., 2016). Após a persistência de um estímulo antigênico durante um processo de envelhecimento ou em condições crônicas, as células T CM recém diferenciadas ( $CD28^+ CD57^{neg}$ ) perdem a expressão de sua molécula coestimuladora CD28 e assumem o fenótipo  $CD28^{neg} CD57^+$  (COLEMAN; ZIMMERLY; YANG, 2021; WALTER et al., 2022b). As células T tardiamente diferenciadas apresentam um fenótipo com a expressão da molécula CD57 juntamente com a reexpressão de CD45RA, com perda da expressão de CCR7 e CD45RO, e uma expressão reduzida de CD28 (KARED et al., 2016). Em determinadas condições de estimulação antigênica, os linfócitos T podem expressar a molécula de MHC-II em sua superfície, e, devido a isso, o HLA-DR tem sido utilizado como um marcador de ativação tardia das células T (REVENFELD et al., 2016).

Em relação aos linfócitos T  $CD4^+$ , os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentaram redução nos valores absolutos de linfócitos T  $CD4^+ CD28^+ CD57^-$  ( $p < 0,001$ ) e T  $CD4^+ CD28^- CD57^-$  ( $P = 0,017$ ), em comparação com os indivíduos saudáveis. Os pacientes com COVID-19 sem neoplasias também apresentaram redução dos valores absolutos de T  $CD4^+ CD28^- CD57^-$  ( $P = 0,047$ ), em comparação com o grupo controle. Quanto aos linfócitos T  $CD8^+$ , os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, apresentaram redução em valores absolutos de linfócitos T  $CD8^+ CD28^+ CD57^-$  ( $P < 0,001$  e  $p = 0,041$ , respectivamente) e T  $CD8^+ CD28^- CD57^-$  ( $p < 0,001$ ). Também apresentaram redução da porcentagem de células T  $CD8^+ CD28^- CD57^-$  dentro do compartimento dos linfócitos T  $CD8^+$  ( $p < 0,001$ ). Ainda em relação aos linfócitos T  $CD8^+$ , os pacientes com neoplasias apresentaram redução dos valores absolutos de T  $CD8^+ CD28^- CD57^+$ , em comparação com o grupo controle ( $p = 0,021$ ). Em relação aos

linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, os pacientes oncológicos apresentaram redução das duas populações celulares em valores absolutos ( $p=0,016$  e  $p=0,027$ , respectivamente). A análise do perfil de ativação dos linfócitos T está descrita na Tabela 3.

O aumento de populações CD28<sup>-</sup> está associado às condições inflamatórias crônicas, como o câncer (HUFF et al., 2019). A expansão de células T senescentes CD8<sup>+</sup> que não expressam CD28 ou que expressam CD57 são descritas na circulação periférica e no microambiente tumoral em vários tipos de neoplasias sólidas e hematológicas (STRIOGA; PASUKONIENE; CHARACIEJUS, 2011). Além disso, pacientes com COVID-19 que apresentam expansão das populações de T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> e/ou T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>, ou ainda, pacientes que apresentam redução de linfócitos T CD28<sup>+</sup>, apresentam pior prognóstico (ANFT et al., 2020; QIN et al., 2020; WANG, F. et al., 2020). Também foi demonstrado que os pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 apresentam expansão de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> e/ou PD-1<sup>+</sup>, o que sugere que o SARS-CoV-2 pode levar à exaustão/senescência dessas células (DE BIASI et al., 2020). Outro estudo recente desenvolvido por Gozzi-Silva e colaboradores (2022) observou, apesar da linfopenia, um aumento da expressão de CD28, HLA-DR, CD38 e PD-1 nos linfócitos T em pacientes graves/críticos, em comparação com indivíduos saudáveis. A expressão de PD-1 está associada à exaustão celular, mas também tem sido associada à evitar a exacerbação das respostas imunes (GOZZI-SILVA et al., 2022; SCHÖNRICH; RAFTERY, 2019; ZENARRUZABEITIA et al., 2021).

No presente estudo, não foi observado aumento da proporção de populações celulares CD28<sup>-</sup> nos pacientes oncológicos. Em valores absolutos, os pacientes oncológicos apresentaram redução dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>. Além disso, também apresentaram redução, em valores absolutos, dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>. A redução dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> também foi observada em valores relativos, ou seja, dentro do compartimento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Em relação à expressão dos marcadores CD57 e HLA-DR, os pacientes oncológicos apresentaram redução em valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>. A redução em valores absolutos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>, mostra que esses pacientes apresentam um comprometimento da ativação celular, visto que CD28 é uma molécula coestimuladora necessária para o segundo sinal de ativação dos linfócitos T (BERNARD; LAMY; ALBERTI, 2002). Como citado anteriormente, embora alguns estudos sugerem que o COVID-19 pode levar à exaustão celular com a expressão de CD57, neste estudo não foi observado um aumento das populações celulares expressando marcadores de ativação persistente/tardia, como o CD57 e HLA-DR. As disfunções observadas

nas APCs, quanto à capacidade de apresentação de antígenos, também podem ser uma possível explicação para o comprometimento da ativação de células T nesses pacientes.

Tabela 3 – Ativação dos linfócitos T.

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
TCD4 CD28+CD57- (% TCD4+)	97,35 (52,12 – 99,94)	93,52 (68,13 – 99,98)	93,21 (78,87 – 99,70)	0,294
TCD4 CD28+CD57- /mm3	665,60 (402,45 – 1177,46) <b>a</b>	327,03 (3,74 – 696,98) <b>b</b>	568,26 (74,34 – 1171,51) <b>a</b>	<0,001
TCD4 CD28-CD57- (% TCD4+)	2,64 (0,06 – 47,88)	3,30 (0,01 – 9,97)	1,61 (0,05 – 15,16)	0,088
TCD4 CD28-CD57- /mm3	20,24 (0,42 – 767,66) <b>a</b>	7,09 (0,01 – 60,11) <b>b</b>	9,17 (0,12 – 132,05) <b>b</b>	0,006
TCD4 CD28-CD57+ (% TCD4+)	2,08 (0,03 – 45,60)	2,63 (0,01 – 21,90)	3,92 (0,21 – 19,67)	0,398
TCD4 CD28-CD57+ /mm3	17,33 (0,21 – 731,10)	7,22 (0,01 – 132,05)	21,78 (1,81 – 143,05)	0,291
TCD8 CD28+CD57- (% TCD8+)	63,61 (37,71 – 89,46)	55,36 (34,58 – 82,50)	61,19 (24,21 – 87,86)	0,692
TCD8 CD28+CD57- /mm3	227,68 (136,61 – 650,85) <b>a</b>	106,26 (4,95 – 272,50) <b>b</b>	162,55 (14,43 – 627,38) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57- (% TCD8+)	36,38 (10,54 – 62,29) <b>a</b>	14,04 (0,11 – 44,74) <b>b</b>	11,40 (0,14 – 53,87) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57- /mm3	181,43 (36,20 – 494,72) <b>a</b>	18,34 (0,23 – 182,30) <b>b</b>	26,82 (0,31 – 246,49) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57+ (% TCD8+)	20,30 (3,03 – 47,86)	24,67 (0,83 – 55,11)	24,24 (2,66 – 52,57)	0,383
TCD8 CD28-CD57+ /mm3	83,92 (12,92 – 366,00) <b>a</b>	35,88 (0,34 – 135,84) <b>b</b>	44,87 (5,98 – 304,97) <b>a,b</b>	0,026
TCD4 DR+ (%TCD4+)	7,45 (3,13 – 34,76)	10,45 (1,22 – 32,02)	6,65 (4,10 – 17,39)	0,509
TCD4 DR+ /mm3	56,70 (21,23 – 351,97) <b>a</b>	27,94 (1,05 – 132,83) <b>b</b>	39,65 (14,46 – 138,73) <b>a,b</b>	0,018
TCD8 DR+ (%TCD8+)	19,09 (6,70 – 52,54)	27,18 (8,30 – 54,77)	20,32 (7,37 – 54,32)	0,227
TCD8 DR+ /mm3	79,60 (21,25 – 277,68) <b>a</b>	41,62 (3,29 – 146,44) <b>b</b>	56,12 (13,12 – 261,34) <b>a,b</b>	0,023

Análise da expressão dos marcadores CD28, CD57 e HLA-DR nos linfócitos T por citometria de fluxo. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ). TCD4 (linfócitos T CD4<sup>+</sup>); TCD8 (linfócitos T CD8<sup>+</sup>); TCD4 DR<sup>+</sup> e TCD8 DR<sup>+</sup> (linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>).

### 5.2.4 Linfócitos T reguladores (Treg)

Os linfócitos Th também podem ser subdivididos em linfócitos T reguladores (Treg), os quais desempenham um papel importante na manutenção da homeostase imunológica, ao atuar como potentes células imunossupressoras. No contexto da COVID-19, as células Treg atuam suprimindo a inflamação exacerbada nos pacientes infectados, do mesmo modo que atenuam a resposta imune do hospedeiro para combater a infecção (WANG et al., 2021).

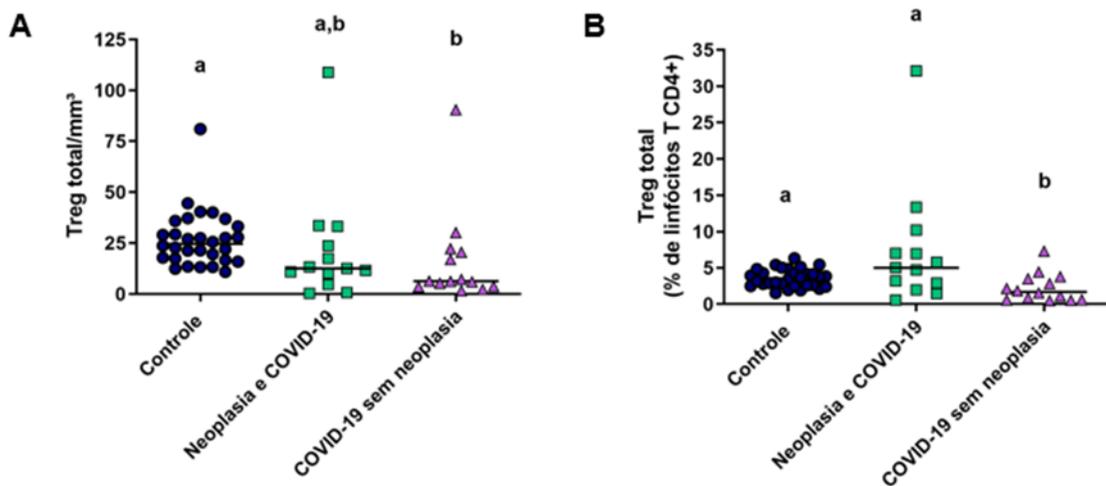
Nos pacientes com COVID-19 sem neoplasias, foi observada uma redução de linfócitos Treg totais, tanto nos valores absolutos ( $p=0,003$ , Figura 13A), quanto nos valores relativos ( $p=0,041$ , Figura 13B), quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Nesses pacientes também foi observada redução dos linfócitos Treg naive (Treg N), nos valores relativos ( $p=0,002$ , Figura 14B) e absolutos ( $p=0,001$ , Figura 14A), e dos valores absolutos de linfócitos Treg de memória (Treg M) ( $p=0,019$ , figura 15), em comparação ao grupo controle.

Os pacientes oncológicos não diferiram do grupo controle em relação à contagem absoluta e relativa dos linfócitos Treg totais. Porém, os pacientes oncológicos apresentaram diminuição de valores absolutos de linfócitos Treg N ( $p=0,010$ , Figura 14A) e linfócitos Treg M ( $p=0,018$ , Figura 15), em comparação com o grupo controle. Entretanto, quando analisado o compartimento dos linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$ , os pacientes oncológicos apresentaram aumento da proporção de linfócitos T  $CD4^+ CD25^+$  ( $p=0,022$ ) e principalmente, de linfócitos T  $CD8^+ CD25^+$  ( $p=0,009$ ), onde a mediana dos pacientes oncológicos foi quase doze vezes maior em comparação com os indivíduos saudáveis (Apêndice A).

Um subconjunto de células Tregs derivadas da periferia, que apresentam o fenótipo  $CD4^+ Foxp3^-$ , são reconhecidas como células reguladoras T1 (Tr1) e foram descritas inicialmente em 1997 por Groux e colaboradores, onde apresentaram função supressora de células T antígeno-específicas (GROUX et al., 1997). As células Tr1 têm sido reconhecidas pela capacidade de secretar IL-10 e pelo fenótipo  $FoxP3^-$  (LEVINGS et al., 2005). Essas células são induzidas pela ativação crônica de linfócitos T  $CD4^+$  por antígeno, na presença da IL-10 (GROUX et al., 1997; ZENG et al., 2015). A principal função atribuída às células Tr1 é a supressão da resposta de células efetoras (SONG et al., 2021). As células Tr1 são responsáveis por suprimir as respostas de linfócitos T e APCs, principalmente por meio da secreção de IL-10 (GREGORI et al., 2010; PELLERIN et al., 2014; MANAVALAN et al., 2003). As células T  $CD8^+ CD25^+$  também constituem um subconjunto de células T  $CD8^+$  que apresentam função imunossupressora (SCHÄFER; ZERNECKE, 2021). Diante disso, os resultados obtidos sugerem que embora os pacientes com câncer apresentem valores absolutos de linfócitos Treg

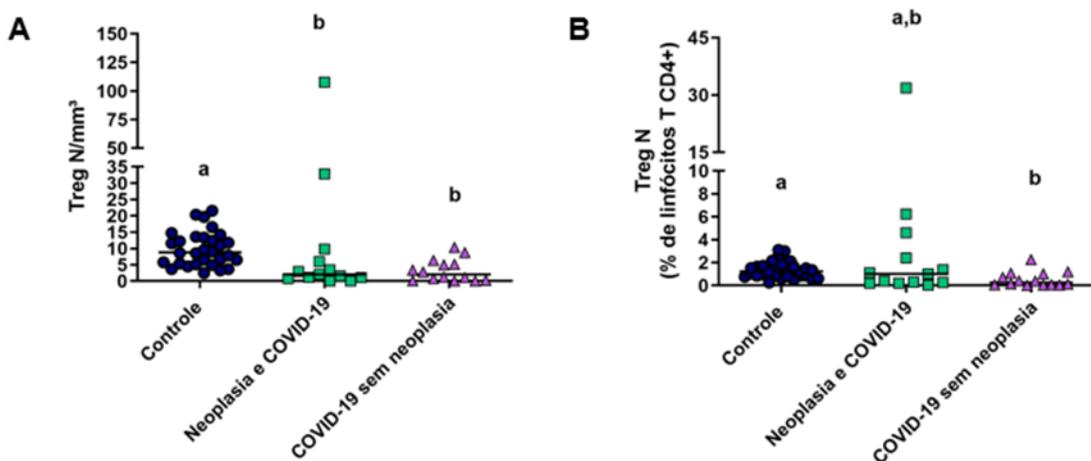
N e de Treg M diminuídos, dentro do compartimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> há um aumento da proporção de linfócitos T CD25<sup>+</sup>, assumindo assim, um fenótipo imunossupressor.

Figura 13 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T reguladores (Treg) no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos Treg em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (a é diferente estatisticamente de b; a,b não difere estatisticamente de a nem de b).

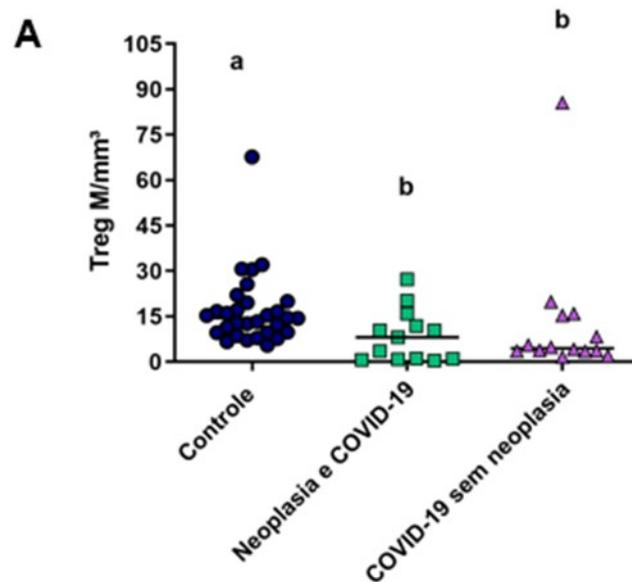
Figura 14 - Contagem absoluta e relativa de linfócitos T reguladores Naive (Treg N) no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de linfócitos Treg N em sangue periférico por citometria de fluxo. A

mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Figura 15 - Contagem absoluta de linfócitos T reguladores de memória (Treg M) no sangue periférico.



Valores absolutos de linfócitos Treg M em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**).

### 5.2.5 Análise dos linfócitos B

Além da análise dos linfócitos B totais e linfócitos B maduros, foi analisado o compartimento dos linfócitos B. Esses foram subclassificados em: linfócitos B naive (BN), transicionais, BM-NS (linfócitos B de memória *non-switched*), BM-CS (linfócitos B de memória *class-switched*), BM-DN (linfócitos B de memória duplo-negativos ( $CD27^- IgD^-$ ) e plasmablastos.

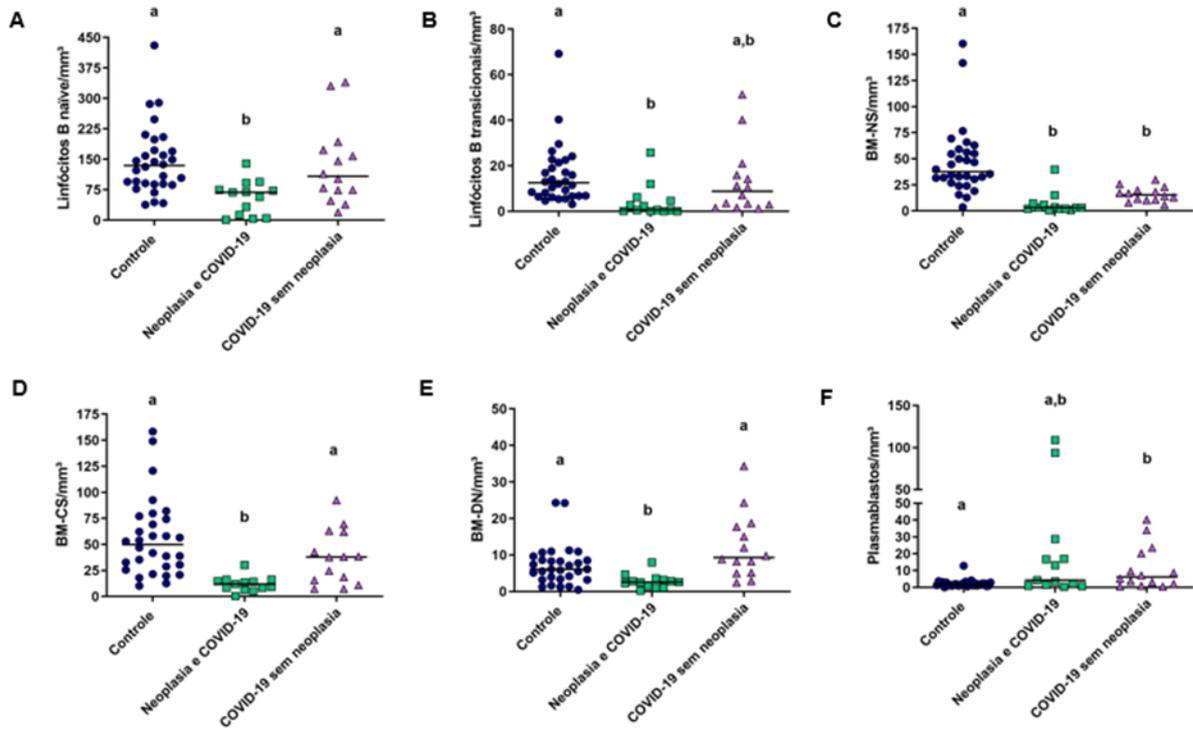
Os linfócitos B transicionais ( $IgM^+ CD24^{++} CD38^{++}$ ), constituem um estágio entre o linfócito B imaturo e o linfócito BN, e, é considerado um estágio celular mais imaturo. A célula BN ( $CD27^{neg} IgM^+ IgD^+$ ), já é considerada uma célula mais madura que migra para os

linfonodos, onde, na presença de um estímulo antigênico, podem se diferenciar a células B de memória (BM). As células BM que não sofreram troca de classe são chamadas de BM-NS ( $CD27^+ IgD^{neg/+} IgM^+$ ), e aquelas que sofreram troca de classe, são chamadas de BM-CS ( $CD27^+ IgD^{neg}$ ). As células BM-DN, não expressam nem CD27 e nem IgD. Os plasmablastos ( $CD20^{neg} IgM^{neg} CD38^{++}$ ) e plasmócitos são o último estágio de diferenciação dos linfócitos B (BLANCO et al., 2018; CARDOSO, 2020; PEREZ-ANDRES et al., 2010).

Como pode ser observado na Figura 16 (Painéis A-D), os pacientes oncológicos apresentaram redução dos valores absolutos de linfócitos BN ( $p < 0,001$ ), linfócitos B transicionais ( $p < 0,001$ ), BM-NS ( $p < 0,001$ ), BM-CS ( $p < 0,001$ ) e BM-DN ( $p = 0,007$ ), em comparação com os indivíduos saudáveis. Além das alterações em valores absolutos, os pacientes oncológicos apresentaram redução nos valores relativos de linfócitos B transicionais ( $p = 0,011$ , Figura 17A) e de BM-NS ( $p = 0,002$ , Figura 17B), quando comparados ao grupo controle. Já os pacientes com COVID-19 sem neoplasias apresentaram redução de BM-NS tanto em valores absolutos, quanto em valores relativos ( $p = 0,001$  e  $p = 0,036$ , respectivamente) (Figuras 16C e 17B). Em relação às células BM-DN, os pacientes com COVID-19 sem neoplasias apresentaram um aumento da proporção dessas células no compartimento dos linfócitos B, em comparação com o grupo controle ( $p = 0,001$ , Figura 17C).

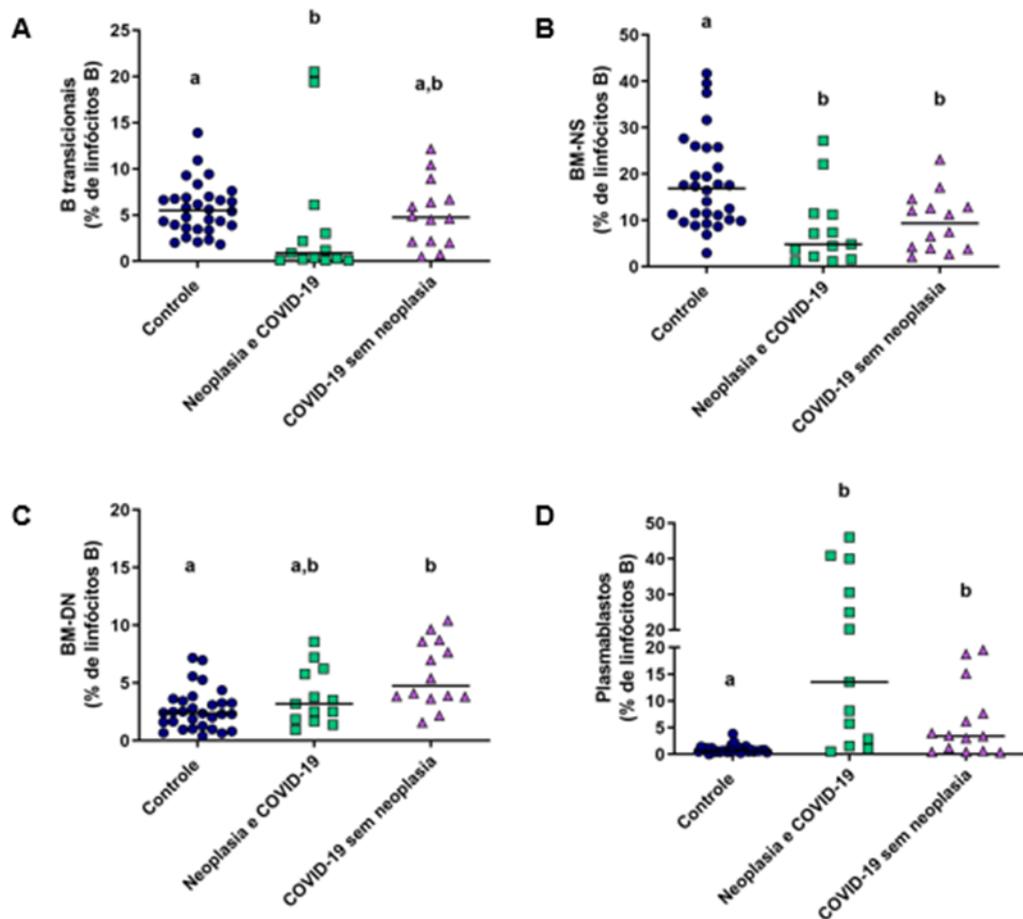
Em relação aos valores relativos de plasmablastos, o grupo de pacientes oncológicos demonstrou resultados semelhantes aos pacientes do grupo não oncológico. Os dois grupos com diagnóstico de COVID-19 apresentaram aumento na proporção de plasmablastos dentro do compartimento dos linfócitos B, em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ , Figura 17D). Em valores absolutos de plasmablastos (Figura 16F), somente o grupo com COVID-19 não oncológico apresentou aumento significativo em relação ao controle ( $p = 0,034$ ).

Figura 16 – Contagem absoluta dos linfócitos B N, transicionais, BM-NS, BM-CS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico.



Valores absolutos de linfócitos BN, transicionais, BM-NS, BM-CS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Figura 17 – Contagem relativa de linfócitos B transicionais, BM-NS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico.



Valores relativos de linfócitos B transicionais, BM-NS, BM-DN e plasmablastos em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Outro estudo recente observou resultados semelhantes em relação ao compartimento de linfócitos B nos pacientes com COVID-19, marcado pela redução de linfócitos B de memória NS e CS em pacientes com quadros clínicos de moderado a crítico, além da redução de células B transicionais nos pacientes com quadro clínico crítico. Também foi observado um aumento de plasmablastos nesse estudo (WALTER et al., 2022b). Em relação ao aumento de plasmablastos, outros estudos na literatura demonstram o mesmo resultado nos pacientes infectados por SARS-CoV-2, principalmente em pacientes que apresentaram manifestações clínicas mais grave da doença (LAING et al., 2020; SOSA-HERNÁNDEZ et al., 2020). Sosa-

Hernández e colaboradores (2020) além de observarem um aumento de plasmablastos nos pacientes com COVID-19, relataram uma diminuição de linfócitos B transicionais.

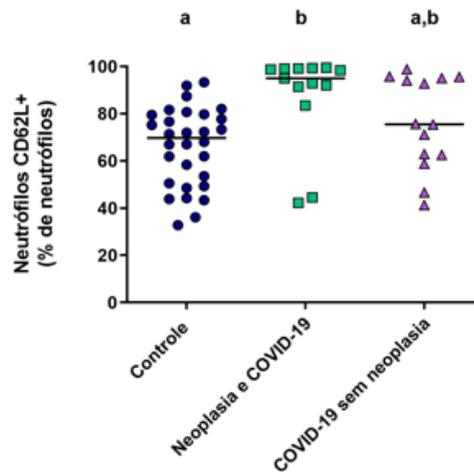
Nos pacientes oncológicos, as alterações dentro do compartimento dos linfócitos B, sugerem um remanejamento celular para produção de anticorpos, evidenciado pelo aumento da proporção de plasmablastos em sangue periférico.

### **5.2.6 Análise da maturação dos neutrófilos e expressão da molécula CD62L**

Foi possível observar, nos grupos com COVID-19, oncológico e não oncológico, um aumento nos valores relativos de neutrófilos maduros em relação ao grupo controle ( $p= 0,004$  e  $p=0,008$ , respectivamente). Em relação aos valores absolutos de neutrófilos maduros, os pacientes oncológicos não apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle. Somente o grupo não oncológico diferiu em relação aos valores absolutos de neutrófilos maduros quando comparado ao grupo controle ( $p= 0,006$ ). Ao analisar os neutrófilos imaturos, os pacientes do grupo não oncológico apresentaram aumento nos valores relativos e absolutos quando comparados ao grupo controle ( $p= 0,009$  e  $p= 0,005$ ). Os pacientes oncológicos não apresentaram diferença significativa quando comparados aos demais grupos (Apêndice A).

Em relação à expressão de CD62L nos neutrófilos, foi possível observar que os pacientes oncológicos apresentaram um aumento expressivo de neutrófilos CD62L<sup>+</sup> quando comparados ao grupo controle ( $p= 0,001$ , Figura 18). O grupo de pacientes sem neoplasias não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos.

Figura 18 - Expressão de CD62L em neutrófilos.



Neutrófilos expressando a molécula CD62L. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. O teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn-Bonferroni foi utilizado para avaliar as diferenças.  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si. (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

A L-selectina CD62L é uma glicoproteína transmembrana tipo I que é expressa na maioria dos leucócitos circulantes, incluindo os neutrófilos. É uma molécula de adesão celular que auxilia na ancoragem ao endotélio e no rolamento dos leucócitos (BONGERS et al., 2021; IVETIC, 2018; IVETIC, VERDEE, HART, 2019). Além disso, acredita-se que a L-selectina tem um papel na amplificação da inflamação, ao permitir que os neutrófilos aderentes possam recrutar ainda mais neutrófilos para o local da inflamação (BARGATZE et al., 1994).

O aumento do percentual de neutrófilos expressando a molécula CD62L observado nos pacientes oncológicos, indica que essas células apresentam uma maior adesão endotelial e pode indicar uma intensa migração para os sítios inflamatórios. Outro estudo desenvolvido por Walter e colaboradores (2022a), também observou um aumento de neutrófilos expressando a molécula CD62L, e esse aumento foi evidenciado nos pacientes com quadro clínico mais grave da COVID-19.

### 5.2.7 Análise dos Monócitos

Os monócitos, juntamente com as células dendríticas, compõem o sistema fagocitário mononuclear no sangue periférico. Os monócitos são células imunes inatas, consideradas células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), que detectam e fagocitam patógenos,

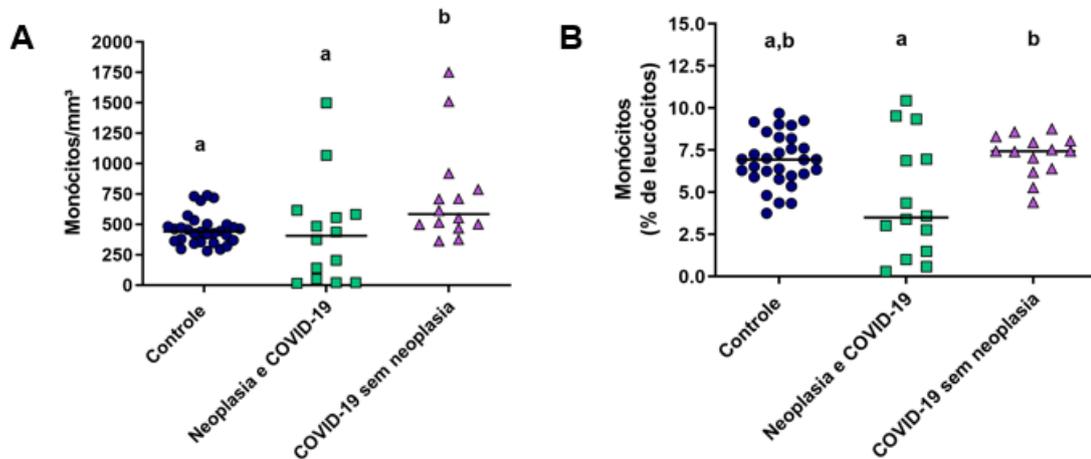
medeiam respostas imunes e o recrutamento de leucócitos, assim como participam ativamente da regulação do processo inflamatório (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE- SCHREPPING, 2021).

Neste estudo, os monócitos foram subdivididos em três populações principais, de acordo com a expressão de seus marcadores de superfície CD14 e CD16, e sabe-se que apresentam funções distintas na homeostase e doença (KAPELLOS et al., 2019). Assim, os monócitos foram subdivididos em monócitos clássicos (cMO) (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup>), não-clássicos (ncMO) (CD14<sup>-/low</sup> CD16<sup>+</sup>) e intermediários (iMO) (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>). Os monócitos intermediários e não-clássicos também são subclassificados como TIMAS (macrófagos teciduais) (CARDOSO et al., 2019).

Em infecções virais, como na COVID-19, os monócitos ativados migram para os tecidos, onde desempenharão suas funções pró e anti-inflamatórias (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE- SCHREPPING, 2021). Mudanças quantitativas e qualitativas nos monócitos são observadas nos casos mais críticos da COVID-19 (CAMPANA et al., 2022).

Em relação à análise dos monócitos totais, os pacientes oncológicos não apresentaram diferença na contagem absoluta e relativa, em comparação com os indivíduos saudáveis (Figura 19A e 19B). Já em relação aos pacientes do grupo não oncológico com COVID-19, foi observado um aumento nos valores absolutos de monócitos em relação ao grupo controle ( $p=0,018$ , Figura 19A) e ao grupo oncológico ( $p=0,021$ , Figura 19A). Os pacientes do grupo não oncológico também apresentaram valores relativos de monócitos mais elevados, em relação aos pacientes com neoplasias ( $p=0,041$ , Figura 19B), mas não apresentaram diferença significativa dos valores relativos em relação ao grupo controle.

Figura 19 - Contagem absoluta e relativa de monócitos no sangue periférico.



Valores absolutos (A) e relativos (B) de monócitos em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn-Bonferroni para os valores absolutos de monócitos. Para avaliar as diferenças nos valores relativos de monócitos foi utilizado o teste ANOVA e *post-hoc* de Games-Howell. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (a é diferente estatisticamente de b; a,b não difere estatisticamente de a nem de b).

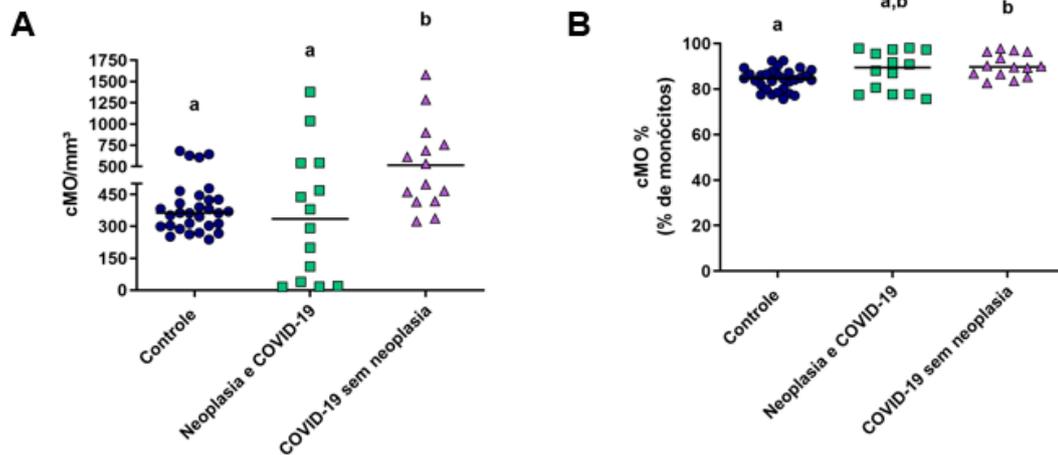
Na análise do compartimento monocítico, também foi avaliada a população de monócitos que expressam a molécula CD56. Foi observado aumento dos valores relativos de monócitos CD56<sup>+</sup>, nos pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, quando comparados ao grupo controle ( $p = 0,003$  e  $p = 0,019$ , respectivamente) (Apêndice A).

CD56 é uma molécula de adesão celular neural. Os monócitos CD56<sup>+</sup> estão em baixas concentrações no sangue periférico de indivíduos saudáveis e demonstraram-se elevados em condições associadas à autoimunidade, como na artrite reumatoide (CAMPANA et al., 2022; KRASSELT et al., 2013). Em um recente estudo publicado em agosto de 2022, Campana e colaboradores observaram um aumento de monócitos CD56<sup>+</sup> em pacientes com COVID-19 grave. Esse aumento de monócitos expressando CD56<sup>+</sup> foi correlacionado inversamente com a concentração de monócitos CD16<sup>+</sup>, e foi sugerido como um marcador inflamatório de prognóstico desfavorável em pacientes com COVID-19. Outro estudo recente realizado por Walter e colaboradores (2022a) também encontrou um aumento de monócitos CD56<sup>+</sup> nesses pacientes, e foi evidente nos quadros clínicos de moderado a crítico.

Em relação à avaliação dos subtipos de monócitos, os pacientes com COVID-19 sem neoplasia apresentaram aumento na contagem absoluta de cMO em relação ao controle ( $p = 0,009$ ) e em relação ao grupo oncológico ( $P = 0,016$ ) (Figura 20A). Esse aumento de cMO

também foi evidenciado dentro do compartimento dos monócitos, quando comparado o grupo sem neoplasia com COVID-19, com o grupo controle ( $p= 0,012$ , Figura 20B).

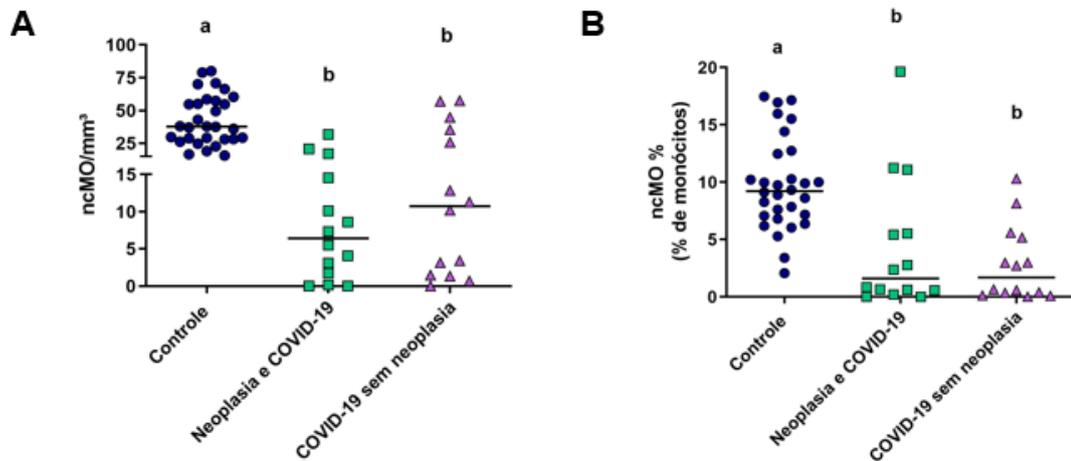
Figura 20 – Monócitos clássicos (cMO).



Valores absolutos de cMO (A) e valores relativos de cMO dentro do compartimento monocítico (B) por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Já em relação aos ncMO, os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, apresentaram diminuição dos valores absolutos de ncMO em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p = 0,002$ , respectivamente) (Figura 21A). Essa diminuição de ncMO também foi observada quando analisado os valores relativos dentro do compartimento de monócitos, ao comparar os pacientes com COVID-19 e o grupo controle ( $p < 0,001$ , Figura 21B).

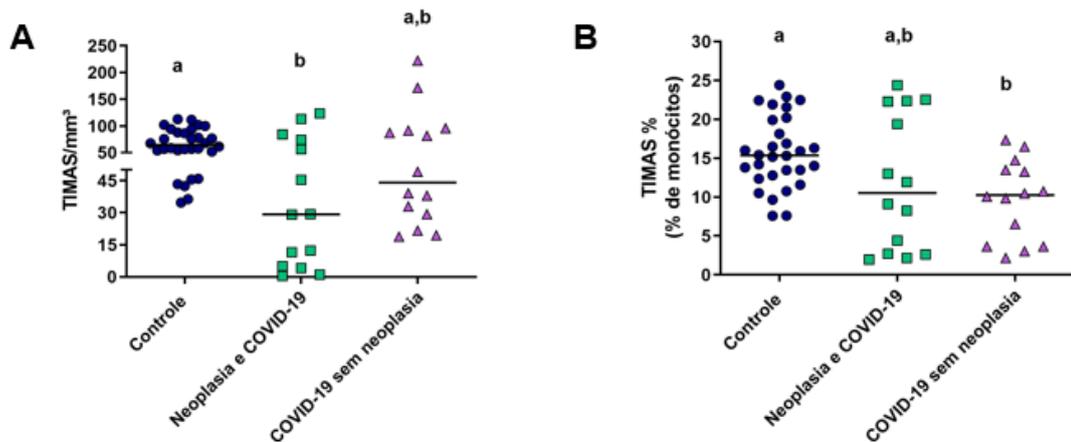
Figura 21 – Monócitos não clássicos (ncMO).



Valores absolutos de ncMO (A) e valores relativos de ncMO dentro do compartimento monocítico (B) por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $P \leq 0,05$ ). (**a** é diferente estatisticamente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**).

Com base nos resultados anteriores, foi possível observar que os pacientes oncológicos apresentaram valores absolutos reduzidos de TIMAS (iMO e ncMO juntos) em relação ao grupo controle ( $p=0,024$ , Figura 22A), e que se dá às custas da redução de ncMO nesses pacientes. O grupo de pacientes sem neoplasias com COVID-19 não apresentou diferença significativa quando comparado aos demais grupos. Dentro do compartimento dos monócitos, os pacientes com COVID-19 do grupo sem neoplasias, apresentaram diminuição dos valores relativos de TIMAS em relação ao grupo controle ( $p=0,012$ ). O mesmo não foi significativo para o grupo de pacientes oncológicos (Figura 22B). Em relação aos iMO, não houve diferença significativa entre os grupos comparados (Apêndice A).

Figura 22 - Macrófagos teciduais (TIMAS).



Valores absolutos de TIMAS (A) e valores relativos de TIMAS dentro do compartimento monocítico (B). A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $P \leq 0,05$ ). (a é diferente estatisticamente de b; a,b não difere estatisticamente de a nem de b).

Os cMO são células altamente fagocíticas e desempenham um importante papel na resposta contra patógenos, apresentando alta adesão endotelial e capacidade migratória, enquanto que os iMO estão relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio, apresentação de antígenos, proliferação e estimulação de células T e angiogênese. Os ncMO são mais responsivos aos estímulos virais, são especializados em fagocitose mediada por complemento e FcR, e também desempenham um papel importante na regulação da inflamação vascular (CARDOSO, 2020; SAMPATH *et al.*, 2018; WALTER *et al.*, 2022b).

Neste estudo, os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentaram redução dos valores absolutos e relativos de monócitos não clássicos em sangue periférico. A diminuição de ncMO em pacientes com COVID-19 já foi descrita em outros estudos e tem sido correlacionada com quadros clínicos mais graves da doença (GATTI *et al.*, 2020; WALTER *et al.*, 2022a).

### 5.2.8 Análise da Expressão de HLA-DR nos Monócitos

HLA-DR é um antígeno leucocitário humano de classe II (MHC II) comumente expresso nas células apresentadoras de antígenos, cuja função é apresentar antígenos processados nas APCs para os linfócitos T (MENGOS; GASTINEAU; GUSTAFSON, 2019; NEEFJES *et al.*, 2011).

Além da análise dos monócitos totais e seus subtipos, neste estudo, também foi avaliada a expressão da molécula de superfície HLA-DR nos monócitos dos pacientes com COVID-19. Ao avaliar a expressão de HLA-DR nos monócitos, foi possível identificar que o grupo de pacientes oncológicos apresentou diminuição da expressão de HLA-DR tanto nos cMO, quanto nos ncMO, quando comparado ao grupo controle ( $p= 0,007$  e  $p= 0,025$ , respectivamente). O grupo de pacientes com COVID-19 sem neoplasia não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle e ao grupo oncológico. Em relação à expressão de HLA-DR nos monócitos totais, iMO e TIMAS, não houve diferença estatística entre os grupos comparados (Tabela 4).

Tabela 4 – Expressão de HLA-DR em monócitos.

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem Neoplasia	P
HLA-DR Monócitos (IFM)	10137,13 (3099,94 - 27788,00)	5028,99 (808,75 - 17142,88)	8975,39 (1205,99 - 35106,90)	0,060
HLA-DR cMO (IFM)	9852,00 (2701,23 - 18734,22) <b>a</b>	4573,73 (346,98 - 15988,40) <b>b</b>	8597,20 (1084,96 - 34220,07) <b>a,b</b>	0,010
HLA-DR iMO (IFM)	20547,49 (4095,82 - 42651,44)	13854,43 (3718,79 - 74561,71)	16011,43 (3096,65 - 62022,56)	0,416
HLA-DR ncMO (IFM)	13054,77 (5597,31 - 29060,58) <b>a</b>	5915,94 (2176,32 - 34107,44) <b>b</b>	10889,87 (1528,39 - 26181,12) <b>a,b</b>	0,026
HLA-DR TIMAS (IFM)	15824,14 (6289,47 - 29529,78)	8390,55 (3880,20 - 74561,71)	15240,65 (2937,77 - 39602,03)	0,449

As variáveis estão apresentadas como mediana (mínimo e máximo). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si. (**a** é estatisticamente diferente de **b**; **a,b** não difere estatisticamente de **a** nem de **b**). Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de Dunn-Bonferroni para avaliar as diferenças significativas e valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Abreviaturas: cMO: monócitos clássicos; iMO: monócitos intermediários; ncMO: monócitos não-clássicos; TIMAS: macrófagos teciduais (iMO+ncMO); IFM: intensidade de fluorescência média.

Monócitos com baixa expressão ou perda de expressão de HLA-DR, reconhecidos como monócitos CD14+ HLA-DR<sup>low/neg</sup>, constituem uma população celular maior, denominada de células supressoras derivadas de linhagem mieloide (MDSCs) e são reconhecidas como células supressoras derivadas de linhagem mieloide monocíticas (M-MDSCs) (MENGOS; GASTINEAU; GUSTAFSON, 2019). A baixa expressão de HLA-DR em monócitos é reconhecida como um indicador de imunossupressão da resposta imune inata e confere um estado denominado de imunoparalisia, como é descrita a supressão da resposta imune induzida

pela sepse (LEIJTE et al., 2020). As MDSCs se desenvolvem em condições de inflamação crônica e são responsáveis por suprimir respostas de células T (HEDGE; LEADER; MERAD, 2021; KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021). Como citado anteriormente, o HLA-DR é um MHC-II expresso nas APCs, por onde são apresentados os antígenos ao TCR, responsável por ativação dessas células imunes. Com a perda da expressão de HLA-DR nos monócitos, essas células migram de um estado inflamatório para um fenótipo anti-inflamatório (MENGOS; GASTINEAU; GUSTAFSON, 2019). Desse modo, os monócitos com baixa expressão de HLA-DR apresentam uma capacidade reduzida de apresentação de antígenos aos linfócitos T.

A baixa expressão de HLA-DR em monócitos foi relatada em muitos estudos com pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 e correlacionado com a gravidade da doença (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020; KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020; SPINETTI et al., 2020). Já foi descrito anteriormente que a IL-6 pode inibir a expressão de HLA-DR, o que pode explicar a redução da expressão de HLA-DR nos monócitos dos pacientes com COVID-19, visto que concentrações elevadas de IL-6 estão marcadamente presentes nesses pacientes, principalmente nos pacientes críticos (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020). Além disso, as MDSCs exibem uma função inibitória das células dendríticas, o que pode explicar o declínio dessa população celular observada nos pacientes com COVID-19 (CHANG et al., 2021).

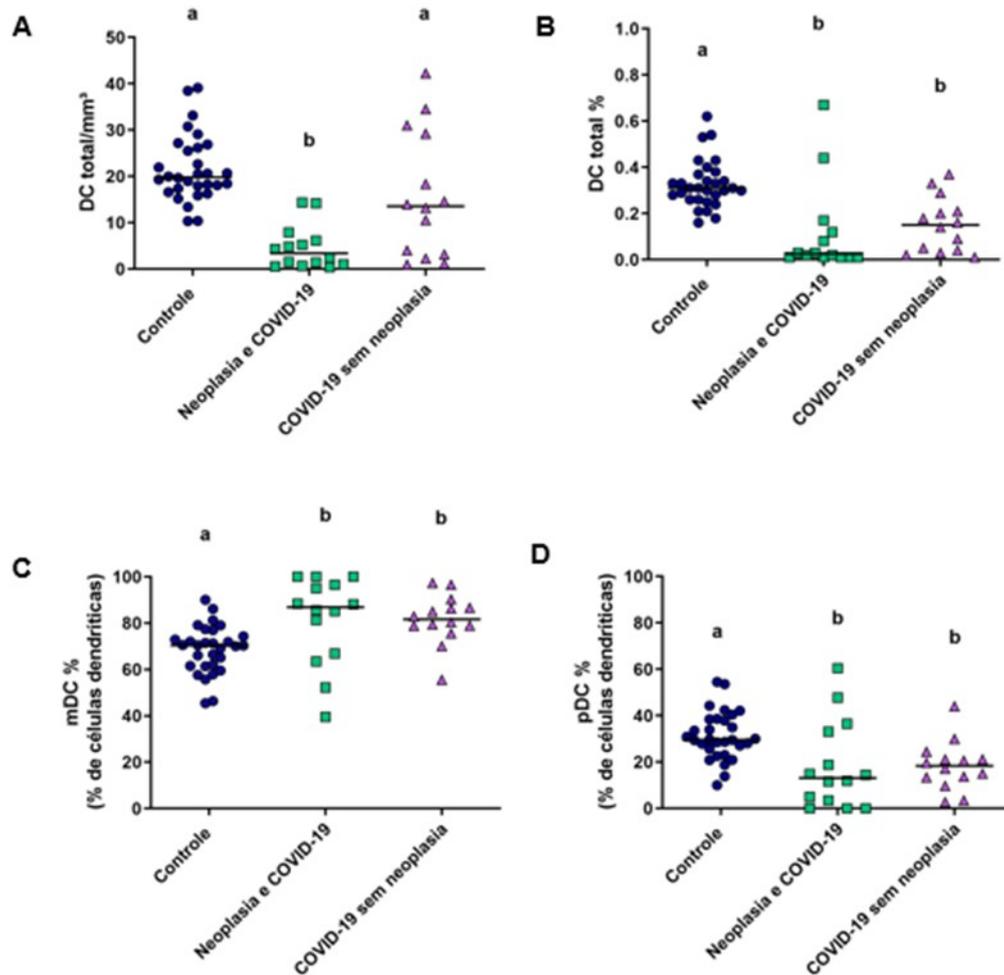
### **5.2.9 Análise das células dendríticas (DCs)**

As células dendríticas integram a primeira linha de defesa do hospedeiro e fazem um elo central entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. São responsáveis pela secreção de citocinas e ativação de outras células imunes inatas, como as células NK, e medeiam a resposta imune adaptativa por meio da interação com os linfócitos T (ROQUILLY; MINTERN; VILLADANGOS, 2022). As células dendríticas têm como característica a forte expressão de HLA-DR (MHC-II), e, por isso, a apresentação de antígenos aos linfócitos Th tem sido considerada a sua principal função (CARDOSO, 2020; O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015). No sangue periférico, as células dendríticas podem ser subclassificadas em DCs clássicas

ou mieloides (cDCs ou mDCs, CD11c<sup>++</sup> CD123<sup>dim</sup>) e DCs plasmocitóides (pDCs, CD11c<sup>dim</sup> CD123<sup>++</sup>) (WALTER et al., 2022b).

Em relação à análise das células dendríticas, foi observada uma redução da porcentagem dessa população celular em sangue periférico, tanto nos pacientes oncológicos, quanto nos pacientes com COVID-19 sem neoplasias, quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p = 0,003$ , respectivamente) (Figura 23B). Em valores absolutos essa redução só foi significativa nos pacientes oncológicos, em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ), onde foi observada uma redução de mais de cinco vezes (Figura 23A). Os pacientes oncológicos apresentaram redução dos valores absolutos de células dendríticas clássicas/mielóides (mDC) e de células dendríticas plasmocitóides (pDC), em comparação com o grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Apêndice A). Já nos pacientes com COVID-19 sem neoplasias, somente a redução das pDC foi significativa em comparação com os indivíduos saudáveis ( $p = 0,002$ ) (Apêndice A). Dentro do compartimento das células dendríticas, embora diminuídas em quantidade, foi observado um aumento da porcentagem de mDC nos pacientes oncológicos ( $p = 0,006$ ) (Figura 23C). Os pacientes com COVID-19 sem neoplasias também apresentaram um aumento da proporção de mDCs, em comparação com o grupo controle ( $p = 0,007$ ) (Figura 23C). Com isso, também foi observada uma redução da porcentagem de pDC nos pacientes oncológicos ( $p = 0,006$ ) e nos pacientes com COVID-19 sem neoplasias ( $p = 0,007$ ) em comparação com o grupo controle (Figura 23D). Essas alterações dentro do compartimento das células dendríticas corroboram com a relação pDC/mDC diminuída nos pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, em comparação com os indivíduos saudáveis ( $p = 0,006$  e  $p = 0,007$ , respectivamente) (Apêndice A).

Figura 23 - Contagem absoluta e relativa de células dendríticas e seus subconjuntos em sangue periférico.



Valores absolutos de células dendríticas (A), valores relativos de células dendríticas (B), valores relativos de mDC (C) e valores relativos de pDC (D) dentro do compartimento de DCs, em sangue periférico por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo está representada pelas linhas traçadas. As diferenças foram avaliadas com o teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ). (a é diferente estatisticamente de b).

Alguns estudos têm revelado que além da redução substancial de células dendríticas circulantes, os pacientes com COVID-19 apresentam DCs disfuncionais, no que diz respeito à apresentação de antígenos durante a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (ARUNACHALAM et al., 2020; PARACKOVA et al., 2020; SAICHI et al., 2021; ZHOU, R. et al., 2020). É observado, em pacientes com COVID-19 gravemente doentes, um declínio das DCs e disfunção dessa população celular, as quais apresentam uma capacidade prejudicada de apresentação de antígenos e de secretar citocinas antivirais, principalmente o IFN-I. O aumento da apoptose de DCs, alterações na distribuição dessa população celular e a inibição exercida pelas MDSCs,

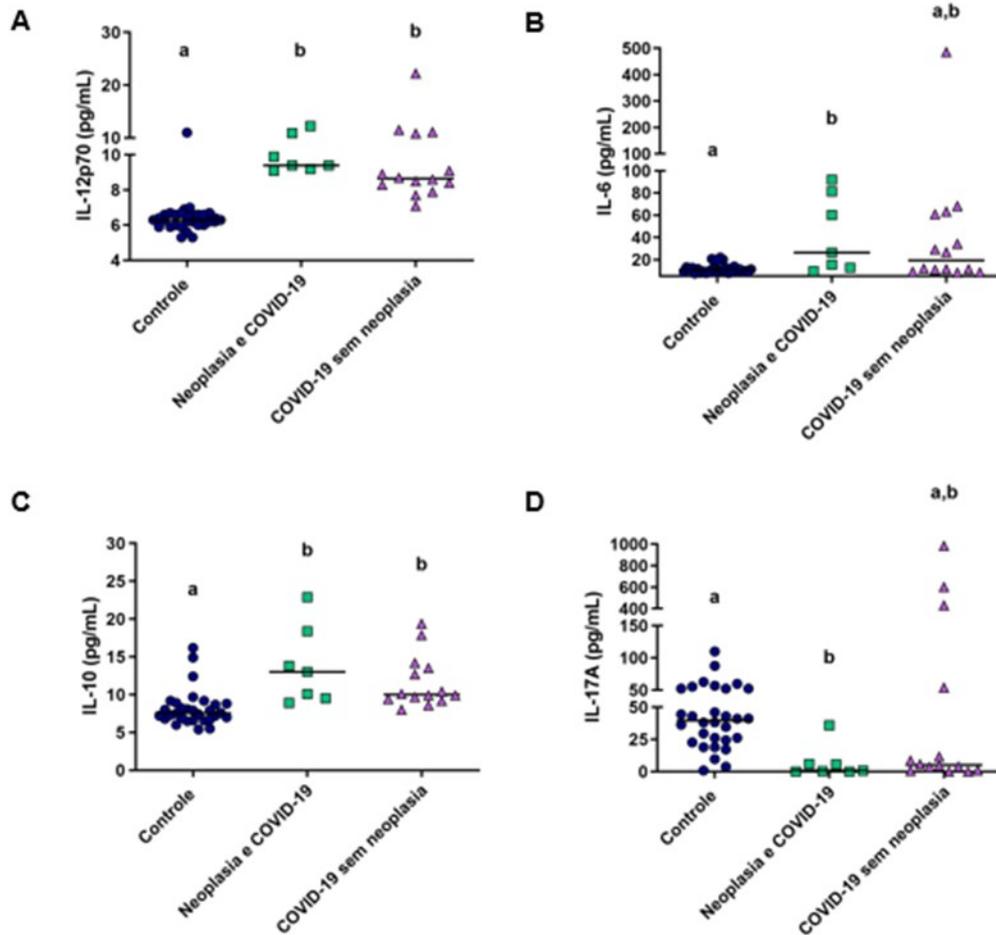
podem explicar a depleção de DCs nos pacientes com COVID-19 grave (CHANG et al., 2021). Outros estudos também revelaram uma diminuição da contagem de pDCs em pacientes com COVID-19 (BORCHERDING et al., 2021; SANCHEZ-CERRILLO et al., 2020; WALTER et al., 2022a). Sabe-se que as células dendríticas plasmocitoides desempenham um papel importante na imunidade antiviral, devido a sua capacidade de produzir grandes quantidades de IFN-I (FITZGERALD-BOCARSLY et al., 2008; ZHOU, P. et al., 2020). O comprometimento da função das DCs pode levar a atrasos nas respostas de linfócitos T durante a infecção por SARS-CoV-2 (ZHOU, P. et al., 2020).

Neste estudo, os pacientes oncológicos apresentaram valores absolutos de células dendríticas mais reduzidos em comparação com os pacientes com COVID-19 sem neoplasias e ao grupo controle, e, ainda, uma expressiva redução de pDCs em comparação com o grupo controle, o que indica que esses pacientes podem ter uma ativação de linfócitos T via apresentação de antígenos pelas DCs comprometida, e também um comprometimento da produção de IFN-I, que é responsável por induzir uma forte resposta antiviral.

### 5.3 ANÁLISE DAS CITOCINAS PLASMÁTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Em relação à análise do padrão de citocinas plasmáticas, como pode ser observado na Figura 24, Painéis A-D, os pacientes oncológicos apresentaram aumento das concentrações de IL-12p70 ( $p < 0,001$ ), IL-10 ( $p = 0,001$ ), IL-6 ( $p = 0,012$ ) e uma expressiva redução da IL-17A ( $p = 0,002$ ) em comparação com os indivíduos saudáveis. Já nos pacientes com COVID-19 do grupo não oncológico, foi observado um aumento da IL-12p70 ( $p < 0,001$ ) e IL-10 ( $p < 0,001$ ), em comparação com o grupo controle, conforme Figura 24, Painéis A-D.

Figura 24 - Concentrações plasmáticas das citocinas IL-12p70, IL-6, IL-10 e IL-17A.



Concentrações plasmáticas de citocinas pró e anti-inflamatórias por citometria de fluxo. O teste de Kruskal-Wallis com teste *post hoc* Dunn-Bonferroni foi utilizado para avaliar as diferenças.  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. (a é diferente estatisticamente de b; a,b não difere estatisticamente de a nem de b). Abreviaturas: IL: interleucina.

Alterações no perfil de citocinas têm sido relatado desde os primeiros estudos sobre a COVID-19. Os casos mais críticos da doença são marcados por uma exacerbação da resposta inflamatória (YANG et al., 2020). A tempestade de citocinas é considerada a principal causa da SRAG e falência de múltiplos órgãos na COVID-19 (BAKOUNY et al., 2020; HU et al., 2020; YE et al., 2020). Vários estudos observaram concentrações elevadas de IL-6 nos pacientes infectados por SARS-CoV-2, correlacionando com casos mais graves da doença (CHEN, X. et al., 2020; GAO et al., 2020; RUAN et al., 2020; ZHOU, F. et al., 2020; WAN et al., 2020; WU et al., 2020). A IL-6 é secretada por uma ampla gama de células distintas, e está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, como nas respostas imunes, na inflamação e na hematopoiese (COSTELA-RUIZ et al., 2020). Essa interleucina também é uma

das principais citocinas encontradas no microambiente tumoral, e sua superexpressão é relatada em praticamente todos os tipos de tumores (KUMARI et al., 2016). Neste estudo, somente os pacientes oncológicos apresentaram diferença significativa nas concentrações de IL-6 em relação ao grupo controle. Como citado anteriormente, concentrações elevadas de IL-6 são encontradas em uma variedade de tumores e também em pacientes infectados com SARS-CoV-2, desse modo, a COVID-19 parece exacerbar ainda mais a resposta de IL-6 nos pacientes oncológicos. Como mencionado anteriormente, as concentrações elevadas de IL-6 podem explicar a redução de HLA-DR nos monócitos observada nos pacientes oncológicos (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020). Ainda devido à tempestade de citocinas nos pacientes oncológicos com COVID-19, às concentrações elevadas de IL-6 e algumas vias de sinalização em que a IL-6 está envolvida, supõem-se que possa ocorrer resistência aos quimioterápicos, com diminuição do efeito terapêutico e aumento da mortalidade nos pacientes oncológicos (HEYDARIAN et al., 2021).

A respeito das concentrações de IL-10 nos pacientes oncológicos, a sua relação com a patogênese e o desenvolvimento tumoral apresenta controvérsias na literatura, onde alguns estudos defendem a relação positiva da IL-10 para a promoção do tumor, enquanto outros estudos acreditam que a IL-10 possa contribuir para supressão da angiogênese (MANINNO et al., 2015). No contexto da COVID-19, vários estudos demonstraram um aumento das concentrações de IL-10 nos pacientes infectados por SARS-CoV-2, e correlacionaram suas concentrações elevadas com a gravidade da doença (COSTELA-RUIZ et al., 2020; CHEN, C. et al., 2020; CHEN, G. et al., 2019; DIA et al., 2020; HUANG et al., 2020; PEDERSEN; HO, 2020; QIN et al., 2020; SUN et al., 2020; WANG, Z. et al., 2020). Um estudo demonstrou que a IL-10 está correlacionada com o desfecho óbito e estabeleceu um *cutt-off* de  $\geq 14$  pg/ml, onde a probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier foi de  $61,7 \pm 7,1\%$  naqueles com valores  $\geq 14$  pg/ml (WALTER et al., 2022a). Outro estudo realizado por Han e colaboradores (2020), identificou concentrações elevadas tanto de IL-10, quanto de IL-6, em pacientes com quadros clínicos graves, e sugeriu que as concentrações dessas citocinas podem ser utilizadas como preditores de gravidade na COVID-19. Além disso, uma das características que difere a síndrome de tempestade de citocinas dos pacientes infectados por SARS-CoV-2 dos pacientes com SARS, infectados por SARS-CoV, são as concentrações da IL-10, onde é observada uma elevação pronunciada de IL-10 nos pacientes com COVID-19 (LU et al., 2020). É importante destacar que concentrações elevadas da IL-10 nos pacientes com COVID-19 pode ser considerado um biomarcador imunossupressor (DIAO et al. 2020; ZHAO, Y. et al. 2020).

Em relação à IL-17A, um estudo conduzido por Walter e colaboradores (2022a), mostrou redução das concentrações dessa citocina no plasma de pacientes infectados com COVID-19, a qual foi evidenciado nos pacientes com quadro clínico mais grave. Uma possível explicação para a redução da IL-17A nos pacientes oncológicos deste estudo, são as elevadas concentrações de IL-10, que atua de forma inibitória em relação às células Th17 (CARDOSO, 2020; WU et al., 2015). A diminuição da IL-17A nesses pacientes também pode ser explicada pela linfopenia, e conseqüentemente redução dos linfócitos T, em particular dos linfócitos Th, visto que a IL-17A é a citocina assinatura do linfócito T helper 17 (Th17).

No cenário da COVID-19, outros estudos também evidenciaram um aumento da IL-12 nos pacientes infectados (LIU, Yingxia, et al., 2020; YOUNG et al. 2021). A IL-12 é secretada principalmente por macrófagos e células dendríticas (HASANVAND, 2022). Essa citocina desempenha um papel importante na produção de interferon tipo II e na diferenciação dos linfócitos Th1 (YAN; SMYTH; TENG, 2018).

#### 5.4 ANÁLISE DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS: MPO E NO

Os pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos, se comportaram de maneira semelhante, ao apresentar expressiva redução das concentrações de NO quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Em relação às concentrações de MPO, não houve diferença significativa entre os grupos comparados (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas de MPO e NO.

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem Neoplasia	P
MPO (uM/mL) mediana (mínimo e máximo)	101,00 (70,00 - 155,00)	96,50 (49,00 - 232,00)	141,50 (72,00 - 184,00)	0,058
NO (uM) mediana (mínimo e máximo)	65,50 (31,00 - 284,00) <b>a</b>	20,00 (3,00 - 61,00) <b>b</b>	30,00 (8,00 - 400,00) <b>b</b>	<0,001

Concentrações plasmáticas de mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico (NO). Para comparação das variáveis foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes entre si ( $p \leq 0,05$ ).

O óxido nítrico atua na regulação de funções vaso-protetoras e possui propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e antivirais (DOMINIC et al., 2021). Outros estudos observaram que pacientes com COVID-19 apresentam redução das concentrações de óxido nítrico em comparação com pacientes saudáveis (DOMINIC et al., 2021; WALTER et al., 2022a).

Também foi observado, que a mortalidade nos pacientes com COVID-19 pode estar associada à redução da produção e disponibilidade endotelial de óxido nítrico (OZDEMIR; YAZICI, 2020). Essa redução de óxido nítrico observada nos pacientes com COVID-19 pode estar associada à síntese reduzida, devido ao comprometimento endotelial, ou a um aumento do consumo (DOMINIC et al., 2021). A redução das concentrações de óxido nítrico observada nos pacientes oncológicos é alarmante, visto que esse grupo de pacientes têm um risco aumentado para desenvolver complicações trombóticas. Foi descrito anteriormente por Lee e Levine (2003), que pacientes com câncer possuem um risco de quatro a sete vezes maior de ter tromboembolismo venoso (TEV) em comparação com a população em geral. Esse estado pró-coagulante observado nos pacientes com doenças oncológicas é atribuído à expressão de fatores da coagulação, pelas próprias células tumorais e de mediadores inflamatórios (BAKOUNY et al., 2020; FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013).

#### 5.5 ANÁLISE DOS ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG

A produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG foi avaliada nos pacientes com COVID-19, oncológicos e não oncológicos. Conforme descrito na Tabela 6, os pacientes oncológicos não apresentaram diferença significativa em relação à produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG, em comparação com os pacientes não oncológicos com COVID-19 ( $p=0,058$  e  $p=0,686$ , respectivamente). Os pacientes do grupo oncológico apresentaram IgM reagente em 33,3% dos pacientes e IgG reagente em 52,9% dos pacientes. Já os pacientes com COVID-19 do grupo sem neoplasias apresentaram IgM reagente em 66,7% dos pacientes e IgG reagente em 47,4% dos pacientes. Do total de 28 pacientes com COVID-19, sete pacientes não apresentaram IgM e IgG reagentes, desses, quatro pacientes oncológicos e três pacientes não oncológicos.

Apesar de menos da metade dos pacientes oncológicos apresentarem IgM reagente (33,3%), isso não parece estar atribuído à dificuldade da produção de anticorpos. Provavelmente está mais relacionado com o tempo do processo infeccioso, visto que mais da metade dos pacientes apresentam IgG reagente (52,9%). Uma revisão sistemática que analisou a resposta de anticorpos à infecção por SARS-CoV-2 identificou que para IgG o tempo médio ou mediano de soroconversão varia entre doze e quinze dias após o início dos sintomas, enquanto que para IgM o tempo médio ou mediano ficou entre quatro e quatorze dias, e a maioria dos estudos analisados relatou a detecção do IgM seguida posteriormente do IgG (POST et al., 2020). Embora diversos estudos tenham demonstrado que os pacientes com

tumores hematológicos têm maior risco de desencadear respostas imunes reduzidas à vacinação contra o vírus SARS-CoV-2 (ADDEO et al., 2021; EHMTSEN et al., 2021; FENDLER et al., 2021; FENDLER et al., 2022; MAIR et al., 2022; MONIN et al., 2021; PEETERS et al., 2021; THAKKAR et al., 2021), não foi encontrada diferença significativa em relação à produção de anticorpos durante a infecção aguda, entre os grupos com COVID-19, oncológicos e não oncológicos nesse estudo. Mais estudos são necessários para avaliação dos anticorpos neutralizantes e para rastrear a duração dos níveis de anticorpos detectáveis, além de avaliar sua associação com imunidade à reinfeção, nesse grupo de pacientes.

Tabela 6 – Anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM e IgG.

Variável	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem Neoplasia	P
<b>IgM</b>			
Reagente n, (%)	5 (33,3%)	10 (66,7%)	0,058
Não reagente n, (%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,058
<b>IgG</b>			
Reagente n, (%)	10 (52,9%)	9 (47,4%)	0,686
Não reagente n, (%)	4 (44,4%)	5 (55,6%)	0,686

Para comparação das variáveis foi utilizado o teste de qui-quadrado. ( $p \leq 0,05$ ).

IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G.

## 5.6 VARIÁVEIS CORRELACIONADAS COM O DESFECHO ÓBITO

As variáveis foram analisadas em correlação com o desfecho (óbito/sobrevivência) somente nos pacientes oncológicos com COVID-19. Por meio do teste de U de Mann-Whitney e teste de ANOVA, as variáveis foram comparadas de acordo com o desfecho nesses pacientes. Inicialmente foi realizada a comparação entre as variáveis de cada tubo e o desfecho, separadamente, e, posteriormente, as variáveis que apresentaram relação significativa com o desfecho foram submetidas a uma regressão logística binária.

Dos 14 pacientes oncológicos com COVID-19, quatro pacientes (28,6%) evoluíram a óbito. Três pacientes evoluíram a óbito dentro de 30 dias e um paciente evoluiu a óbito após 33 dias do diagnóstico. As variáveis que apresentaram alteração significativa em relação ao desfecho incluíram: linfócitos T DP/mm<sup>3</sup> ( $p=0,036$ ), linfócitos T CD8<sup>+</sup> EMRA (% TCD8<sup>+</sup>) ( $p=0,019$ ), linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (TCD8<sup>+</sup>) ( $p=0,006$ ), linfócitos B transicionais/mm<sup>3</sup> ( $p=0,011$ ) e linfócitos B transicionais (% linfócitos B) ( $p=0,034$ ), linfócitos BM-DN (% de linfócitos B) ( $p=0,024$ ), HLA-DR iMO ( $p=0,014$ ), HLA-DR monócitos ( $p=0,019$ ), HLA-DR

cMO ( $p=0,026$ ) e plaquetas/ $\text{mm}^3$  ( $p=0,017$ ). Entretanto, ao submeter essas variáveis à regressão logística binária, o modelo não foi significativo ( $p=0,177$ ).

Isso pode ser explicado por se tratar de um N amostral pequeno, ou por se tratar de uma população heterogênea com diferentes tipos e estágios de tumores. Outra hipótese, é que, além das alterações de células imunes circulantes que foram observadas, outras variáveis não avaliadas como tipo de neoplasia, estágio do tumor, presença de metástases, tipo de tratamento, possam estar influenciando ainda mais o prognóstico desses pacientes com COVID-19.

Tabela 7 – Variáveis correlacionadas com o desfecho óbito.

Variável	Óbito	Alta/Melhora	p
Linfócitos T DP/ $\text{mm}^3$	5,04 (3,49 – 9,25)	2,02 (0,00 – 10,85)	0,036
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> EMRA (% TCD8 <sup>+</sup> )	52,36 (48,28 – 64,29)	20,93 (11,53 – 71,06)	0,019
Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CD57 <sup>-</sup> (TCD8 <sup>+</sup> )	38,67 (34,58 – 53,95)	63,11 (47,69 – 82,50)	0,006
Linfócitos B transicionais/ $\text{mm}^3$	9,05 (2,39 – 25,78)	0,39 (0,00 – 4,56)	0,011
Linfócitos B transicionais (% linfócitos B)	11,20 (0,88 – 20,51)	0,28 (0,09 – 6,11)	0,034
Linfócitos BM-DN (% de linfócitos B)	1,53 (0,92 – 2,50)	3,78 (1,85 – 8,58)	0,024
HLA-DR iMO	4466,42 (3718,79 – 11528,86)	25032,49 (6050,00 – 74561,71)	0,014
HLA-DR monócitos	1811,09 (808,75 – 3213,41)	7390,10 (3738,46 – 17142,88)	0,019
HLA-DR cMO	1582,61 (346,98 – 3153,34)	6841,50 (2523,58 – 15988,40)	0,026
Plaquetas/ $\text{mm}^3$	369500,00 (284000,00 – 556000,00)	202500,00 (33000,00 – 421000,00)	0,017

Análise das variáveis correlacionadas com o desfecho óbito. As variáveis: Linfócitos T DP/ $\text{mm}^3$ , Linfócitos B transicionais/ $\text{mm}^3$ , Linfócitos B transicionais (% linfócitos B) e HLA-DR iMO, foram comparadas utilizando o teste U de Mann-Whitney. As variáveis: Linfócitos T CD8<sup>+</sup> EMRA (% TCD8<sup>+</sup>), Linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (TCD8<sup>+</sup>), Linfócitos BM-DN (% de linfócitos B), HLA-DR monócitos, HLA-DR cMO e Plaquetas/ $\text{mm}^3$ , foram comparadas utilizando o teste de ANOVA. ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentaram, em comparação com o grupo controle, uma intensa linfopenia, marcada pela redução dos linfócitos T, redução da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, redução da proporção e dos valores absolutos de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T DP e linfócitos T DN. Além disso, apresentaram depleção da contagem de linfócitos B e de células NK, assim como de eosinófilos e basófilos. Também foi observado um aumento de plasmablastos.

Em relação aos neutrófilos, os pacientes oncológicos apresentaram aumento da proporção de neutrófilos em sangue periférico, que foi evidenciado pelo aumento da relação N/L nesses pacientes. Também foi observado um aumento da expressão de CD62L nos neutrófilos. Alterações no compartimento monocítico também foram observadas. Os pacientes oncológicos apresentaram uma expressiva diminuição dos ncMO, ademais, apresentaram diminuição da expressão de HLA-DR nos cMO e ncMO. Além da redução substancial de células dendríticas, os pacientes oncológicos apresentaram alterações no compartimento das DCs, com redução de pDCs e aumento de mDCs. Também foram observadas concentrações plasmáticas elevadas de IL-12p70, IL-6 e IL-10, e, em contrapartida, concentrações diminuídas de IL-17A e óxido nítrico nos pacientes com neoplasias malignas quando comparados aos pacientes do grupo controle.

Em comparação com o grupo de pacientes com COVID-19 sem neoplasias, os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentaram contagens absolutas de linfócitos totais, linfócitos T, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T DN e de linfócitos B significativamente mais reduzidas. Contagens absolutas de linfócitos T CD4<sup>+</sup>EM e de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> também estavam mais reduzidas nos pacientes oncológicos em comparação com o grupo sem neoplasia com COVID-19. Os pacientes sem neoplasias com COVID-19 apresentaram valores relativos reduzidos de Treg total dentro do compartimento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em comparação com os pacientes oncológicos. Foi observado ainda, uma proporção de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> significativamente maior nos pacientes com neoplasias. Já em relação aos linfócitos B, os pacientes oncológicos apresentaram valores absolutos mais reduzidos de linfócitos BN, BM-CS e BM-DN, em comparação com os pacientes sem neoplasias com COVID-19. Os valores absolutos de células dendríticas também se apresentaram mais reduzidos nos pacientes oncológicos.

Os resultados obtidos indicam que os pacientes oncológicos com COVID-19 apresentam uma resposta imune mais severamente desregulada. Embora apresentem uma

resposta de citocinas pró-inflamatórias, com elevação de IL-6 e IL-12p70, os pacientes apresentam um quadro de imunossupressão caracterizado pela intensa linfopenia e redução de células dendríticas, diminuição da expressão de HLA-DR nos monócitos, além do aumento de linfócitos T CD4+ e T CD8+ CD25+ e concentrações elevadas de IL-10.

Sendo assim, conclui-se que o comprometimento desencadeado no sistema imune pelo SARS-CoV-2 em pacientes portadores de neoplasias malignas, já debilitado pelo câncer, potencializa ainda mais a disfunção imune, o que leva a gravidade da COVID-19 nesses pacientes.

## **7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

As amostras não foram coletadas na mesma contagem de dias da doença e os pacientes internados estavam em tratamento com diferentes medicações, o que pode alterar o perfil imune nesses pacientes.

A análise das citocinas plasmáticas foi realizada em sete das quatorze amostras dos pacientes oncológicos, devido à problemas na estabilidade das alíquotas.

## **8 PERSPECTIVAS**

Avaliar as populações celulares circulantes em sangue periférico, as citocinas plasmáticas e mediadores inflamatórios, em pacientes com câncer sem infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e comparar essas variáveis com os pacientes com câncer e COVID-19.

## REFERÊNCIAS

ABEBE, Endeshaw Chekol et al. Neuropilin 1: a novel entry factor for SARS-CoV-2 infection and a potential therapeutic target. **Biologics: Targets & Therapy**, v. 15, p. 143, 2021.

ACUTO, Oreste; MICHEL, Frédérique. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 939-951, 2003.

ADDEO, Alfredo *et al.* Immunogenicity of SARS-CoV-2 messenger RNA vaccines in patients with cancer. **Cancer cell**, v. 39, n. 8, p. 1091-1098. e2, 2021.

AHMED-HASSAN, Hanaa et al. Innate immune responses to highly pathogenic coronaviruses and other significant respiratory viral infections. **Frontiers in immunology**, p. 1979, 2020.

AMERE SUBBARAO, Sreedhar. Cancer vs. SARS-CoV-2 induced inflammation, overlapping functions, and pharmacological targeting. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 343-366, 2021.

ANFT, Moritz et al. COVID-19-induced ARDS is associated with decreased frequency of activated memory/effector T cells expressing CD11a<sup>++</sup>. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 12, p. 2691-2702, 2020.

ARUNACHALAM, Prabhu S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1210-1220, 2020.

ASSELAH, Tarik et al. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. **Journal of hepatology**, v. 74, n. 1, p. 168-184, 2021.

BAKOUNY, Ziad *et al.* COVID-19 and cancer: current challenges and perspectives. **Cancer cell**, 2020.

BARGATZE, Robert F. et al. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 5, p. 1785-1792, 1994.

BARKSDALE, Chantal *et al.* COVID-19 and cancer: start the resolution!. **Cancer and Metastasis Reviews**, p. 1-15, 2022.

BASSE, Clémence *et al.* Characteristics and outcome of SARS-CoV-2 infection in cancer patients. **JNCI Cancer Spectrum**, v. 5, n. 1, p. pkaa090, 2021.

BERNARD, Alain; LAMY, Laurence; ALBERTI, Isabelle. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. **Transplantation**, v. 73, n. 1, p. S31-S35, 2002.

BLANCO, Elena et al. Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 6, p. 2208-2219. e16, 2018.

BOECHAT, José Laerte *et al.* The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology—current perspectives. **Pulmonology**, v. 27, n. 5, p. 423-437, 2021.

BONGERS, Suzanne H. et al. Kinetics of neutrophil subsets in acute, subacute, and chronic inflammation. **Frontiers in Immunology**, p. 2386, 2021.

BORCHERDING, Lukas et al. Impaired dendritic cell homing in COVID-19. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 761372, 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde. Brasil, 2022. Link: <https://covid.saude.gov.br/> Acesso em: 29/06/2022

BRODIN, Petter. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. **Nature Medicine**, v. 27, n. 1, p. 28-33, 2021.

CAI, Guangyao et al. Immunological alternation in COVID-19 patients with cancer and its implications on mortality. **Oncoimmunology**, v. 10, n. 1, p. 1854424, 2021.

CAMPANA, Stefania et al. Cutting Edge: Hyperinflammatory Monocytes Expressing CD56 Abound in Severe COVID-19 Patients. **The Journal of Immunology**, v. 209, n. 4, p. 655-659, 2022.

CANTUTI-CASTELVETRI, Ludovico et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 856-860, 2020.

CARDOSO, Chandra Chiappin. **Avaliação das células do sistema imune circulantes e de citocinas plasmáticas de pacientes com cirrose hepática**. 2020. 221 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

CARDOSO, Chandra Chiappin; SANTOS-SILVA, Maria Claudia. Eight-color panel for immune phenotype monitoring by flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 468, p. 40-48, 2019.

CHAMS, Nour *et al.* COVID-19: a multidisciplinary review. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 383, 2020.

CHANDRASHEKAR, Abishek et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. **Science**, v. 369, n. 6505, p. 812-817, 2020.

CHANG, Teding et al. Depletion and Dysfunction of Dendritic Cells: Understanding SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

CHAUDHARY, Belal et al. Neuropilin 1: function and therapeutic potential in cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 2, p. 81-99, 2014.

CHAVDA, Vivek P.; PATEL, Aayushi B.; VAGHASIYA, Darsh D. SARS-CoV-2 variants and vulnerability at the global level. **Journal of Medical Virology**, 2022.

CHEN, Cheng et al. Advances in the research of cytokine storm mechanism induced by Corona Virus Disease 2019 and the corresponding immunotherapies. **Chinese journal of burns**, p. E005-E005, 2020.

CHEN, Guang et al. Clinical and immunologic features in severe and moderate forms of Coronavirus Disease. **J Clin Invest**, v. 82, p. 137244, 2019.

CHEN, Xiaohua et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. **Clinical infectious diseases**, 2020.

CHEN, Zeyu; WHERRY, E. John. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 529-536, 2020.

CHUCKRAN, Christopher A. et al. Prevalence of intratumoral regulatory T cells expressing neuropilin-1 is associated with poorer outcomes in patients with cancer. **Science translational medicine**, v. 13, n. 623, p. eabf8495, 2021.

COLEMAN, Mia J.; ZIMMERLY, Kourtney M.; YANG, Xuexian O. Accumulation of CD28null Senescent T-Cells Is Associated with Poorer Outcomes in COVID19 Patients. **Biomolecules**, v. 11, n. 10, p. 1425, 2021.

COSSARIZZA, Andrea *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. **European journal of immunology**, v. 49, n. 10, p. 1457-1973, 2019.

COSTELA-RUIZ, Víctor J. et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 54, p. 62-75, 2020.

CUPP, Meghan A. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cancer prognosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. **BMC medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-16, 2020.

DAI, Mengyuan *et al.* Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-CoV-2: a multicenter study during the COVID-19 outbreak. **Cancer discovery**, v. 10, n. 6, p. 783-791, 2020.

DALY, James L. et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Science**, v. 370, n. 6518, p. 861-865, 2020.

DE BIASI, Sara et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.

DEL VALLE, Diane Marie et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636-1643, 2020.

DHAMA, Kuldeep et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. e00028-20, 2020.

DIAMOND, Michael S.; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nature immunology**, v. 23, n. 2, p. 165-176, 2022.

DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.

DOMINIC, Paari et al. Decreased availability of nitric oxide and hydrogen sulfide is a hallmark of COVID-19. **Redox biology**, v. 43, p. 101982, 2021.

EHMSEN, Sidse et al. Antibody and T cell immune responses following mRNA COVID-19 vaccination in patients with cancer. **Cancer Cell**, v. 39, n. 8, p. 1034-1036, 2021.

EJAZ, Hasan et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. **Journal of infection and public health**, v. 13, n. 12, p. 1833-1839, 2020.

ESENSTEN, Jonathan H. et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 973-988, 2016.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2013.

FENDLER, Annika et al. Adaptive immunity and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern following vaccination in patients with cancer: the CAPTURE study. **Nature cancer**, v. 2, n. 12, p. 1305-1320, 2021.

FENDLER, Annika et al. COVID-19 vaccines in patients with cancer: immunogenicity, efficacy and safety. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 385-401, 2022.

FERNANDES, Queenie et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 524-540, 2022.

FITZGERALD-BOCARSLY, Patricia; DAI, Jihong; SINGH, Sukhwinder. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 19, n. 1, p. 3-19, 2008.

FRATER, John L. *et al.* COVID-19 and the clinical hematology laboratory. **International journal of laboratory hematology**, v. 42, p. 11-18, 2020.

GALANI, Ioanna-Evdokia *et al.* Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. **Nature immunology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2021.

GAO, Yong *et al.* Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 7, p. 791-796, 2020.

GASMI, Amin *et al.* Interrelations between COVID-19 and other disorders. **Clinical Immunology**, v. 224, p. 108651, 2021.

GATTI, Arianna *et al.* Decrease of non-classical and intermediate monocyte subsets in severe acute SARS-CoV-2 infection. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 9, p. 887-890, 2020.

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J. *et al.* Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 992-1000. e3, 2020.

GOSAIN, Rohit *et al.* COVID-19 and cancer: a comprehensive review. **Current oncology reports**, v. 22, n. 5, p. 1-15, 2020.

GOZZI-SILVA, Sarah Cristina *et al.* Generation of Cytotoxic T Cells and Dysfunctional CD8 T Cells in Severe COVID-19 Patients. **Cells**, v. 11, n. 21, p. 3359, 2022.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GREGORI, Silvia *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10–dependent ILT4/HLA-G pathway. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 6, p. 935-944, 2010.

GRIVAS, P. *et al.* Association of clinical factors and recent anticancer therapy with COVID-19 severity among patients with cancer: a report from the COVID-19 and Cancer Consortium. **Annals of Oncology**, v. 32, n. 6, p. 787-800, 2021.

GROUX, Hervé *et al.* A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, n. 6652, p. 737-742, 1997.

GUDOWSKA-SAWCZUK, Monika; MROCZKO, Barbara. The role of neuropilin-1 (NRP-1) in SARS-CoV-2 infection. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 13, p. 2772, 2021.

HAN, Huan 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, 2020.

HASANVAND, Amin. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, p. 1-10, 2022.

HAZELDINE, Jon; LORD, Janet M. Neutrophils and COVID-19: active participants and rational therapeutic targets. **Frontiers in immunology**, p. 2097, 2021.

HEGDE, Samarth; LEADER, Andrew M.; MERAD, Miriam. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 875-884, 2021.

HEYDARIAN, Mohammad et al. The effect of COVID-19 derived cytokine storm on cancer cells progression: double-edged sword. **Molecular Biology Reports**, p. 1-11, 2021.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HOLMES, Edward C. et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4848-4856, 2021.

HOSSAIN, Md Golzar; AKTER, Sharmin; UDDIN, Md Jamal. Emerging Role of Neuropilin-1 and Angiotensin-Converting Enzyme-2 in Renal Carcinoma-Associated COVID-19 Pathogenesis. **Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 4, p. 902-909, 2021.

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

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUFF, Wei X. et al. The evolving role of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> immunosenescent T cells in cancer immunology. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, p. 2810, 2019.

IVETIC, Aleksandar. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. **Cell and tissue research**, v. 371, n. 3, p. 437-453, 2018.

IVETIC, Aleksandar; HOSKINS GREEN, Hannah Louise; HART, Samuel James. L-selectin: a major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1068, 2019.

JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JAMAL, Muhammad *et al.* Immune dysregulation and system pathology in COVID-19. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 918-936, 2021.

JEANNET, Robin *et al.* Severe COVID-19 is associated with deep and sustained multifaceted cellular immunosuppression. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 9, p. 1769-1771, 2020.

JIMÉNEZ, Dennis; TORRES ARIAS, Marbel. Immunouniverse of SARS-CoV-2. **Immunological Medicine**, p. 1-39, 2022.

JIMENO, Sara *et al.* Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. **European journal of clinical investigation**, v. 51, n. 1, p. e13404, 2021.

KALICIŃSKA, Elżbieta *et al.* Lymphocyte subsets in haematological patients with COVID-19: Multicentre prospective study. **Translational Oncology**, v. 14, n. 1, p. 100943, 2021.

KAPELLOS, T. S.; BONAGURO, L.; GEMÜND, I.; REUSCH, N., *et al.* Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. **Front Immunol**, v. 10, p. 2035, 2019.

KARED, Hassen *et al.* CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 4, p. 441-452, 2016.

KHOURY, Emma *et al.* Differences in Outcomes and Factors Associated With Mortality Among Patients With SARS-CoV-2 Infection and Cancer Compared With Those Without Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA network open**, v. 5, n. 5, p. e2210880-e2210880, 2022.

KNOLL, Rainer; SCHULTZE, Joachim L.; SCHULTE-SCHREPPING, Jonas. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, p. 2952, 2021.

KRASSELT, Marco *et al.* CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence. **Arthritis research & therapy**, v. 15, n. 5, p. 1-8, 2013.

KUDERER, Nicole M. *et al.* Clinical impact of COVID-19 on patients with cancer (CCC19): a cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10241, p. 1907-1918, 2020.

KUMARI, Neeraj *et al.* Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11553-11572, 2016.

KUMAVATH, Ranjith *et al.* The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

LAING, A. G. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623-1635, 2020.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270-284, 2022.

LATIF, Muhammad Bilal *et al.* Immune mechanisms in cancer patients that lead to poor outcomes of SARS-CoV-2 infection. **Translational Research**, 2021.

LEE, Agnes YY; LEVINE, Mark N. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. **Circulation**, v. 107, n. 23\_suppl\_1, p. I-17-I-21, 2003.

LEE, Lennard YW *et al.* COVID-19 mortality in patients with cancer on chemotherapy or other anticancer treatments: a prospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10241, p. 1919-1926, 2020.

LEIJTE, Guus P. *et al.* Monocytic HLA-DR expression kinetics in septic shock patients with different pathogens, sites of infection and adverse outcomes. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2020.

LEVINGS, Megan K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Tr cells. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1162-1169, 2005.

LI, Xiaowei *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 10, n. 2, p. 102-108, 2020.

LI, Zhen-lu; BUCK, Matthias. Neuropilin-1 assists SARS-CoV-2 infection by stimulating the separation of Spike protein S1 and S2. **Biophysical Journal**, v. 120, n. 14, p. 2828-2837, 2021.

LIANG, Wenhua *et al.* Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **The lancet oncology**, v. 21, n. 3, p. 335-337, 2020.

LIU, Wei *et al.* Analysis of factors associated with disease outcomes in hospitalized patients with 2019 novel coronavirus disease. **Chinese medical journal**, v. 133, n. 09, p. 1032-1038, 2020.

LIU, Yingxia *et al.* Elevated plasma levels of selective cytokines in COVID-19 patients reflect viral load and lung injury. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 1003-1011, 2020.

LIU, Yuwei *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e6-e12, 2020.

LOURDA, Magda *et al.* High-dimensional profiling reveals phenotypic heterogeneity and disease-specific alterations of granulocytes in COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 40, p. e2109123118, 2021.

LOWERY, Shea A.; SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1052-1062, 2021.

LU, Ligong *et al.* A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.

LUO, Jia *et al.* Impact of PD-1 Blockade on Severity of COVID-19 in Patients with Lung Cancers PD-1 Blockade and Severity of COVID-19. **Cancer discovery**, v. 10, n. 8, p. 1121-1128, 2020.

MAIR, Maximilian J. *et al.* Humoral immune response in hematooncological patients and health care workers who received SARS-CoV-2 vaccinations. **JAMA oncology**, v. 8, n. 1, p. 106-113, 2022.

MANAVALAN, John S. *et al.* High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. **Transplant immunology**, v. 11, n. 3-4, p. 245-258, 2003.

MANN, Elizabeth R. *et al.* Longitudinal immune profiling reveals key myeloid signatures associated with COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 51, p. eabd6197, 2020.

MANNINO, Mark H. *et al.* The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer letters**, v. 367, n. 2, p. 103-107, 2015.

MARTÍN-SÁNCHEZ, Esperanza *et al.* Immunological biomarkers of fatal COVID-19: A study of 868 patients. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 659018, 2021.

MEHTA, Vikas *et al.* Case Fatality Rate of Cancer Patients with COVID-19 in a New York Hospital System. **Cancer discovery**, v. 10, n. 7, p. 935-941, 2020.

MENGOS, April E.; GASTINEAU, Dennis A.; GUSTAFSON, Michael P. The CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>lo</sup>/neg monocyte: an immunosuppressive phenotype that restrains responses to cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1147, 2019.

MERAD, Miriam *et al.* The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022.

MISTRY, Priyal *et al.* SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

MOAZZAM, Muhammad *et al.* Understanding COVID-19: from origin to potential therapeutics. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 16, p. 5904, 2020.

MONIN, Leticia *et al.* Safety and immunogenicity of one versus two doses of the COVID-19 vaccine BNT162b2 for patients with cancer: interim analysis of a prospective observational study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 6, p. 765-778, 2021.

MORTAZ, Esmail *et al.* The immune response and immunopathology of COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2037, 2020.

NEEFJES, Jacques *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 12, p. 823-836, 2011.

O'KEEFFE, Meredith; MOK, Wai Hong; RADFORD, Kristen J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 22, p. 4309-4325, 2015.

OU, Xiuyuan *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

OZDEMIR, Burak; YAZICI, Ahmet. Could the decrease in the endothelial nitric oxide (NO) production and NO bioavailability be the crucial cause of COVID-19 related deaths?. **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 109970, 2020.

PALUDAN, Søren R.; MOGENSEN, Trine H. Innate immunological pathways in COVID-19 pathogenesis. **Science Immunology**, v. 7, n. 67, p. eabm5505, 2022.

PARACKOVA, Zuzana *et al.* Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils' but impaired monocytes' and dendritic cells' responsiveness. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2206, 2020.

PASSAMONTI, Francesco *et al.* Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 severity in patients with haematological malignancies in Italy: a retrospective, multicentre, cohort study. **The Lancet Haematology**, v. 7, n. 10, p. e737-e745, 2020.

PEDERSEN, Savannah F. *et al.* SARS-CoV-2: a storm is raging. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2202-2205, 2020.

PEETERS, M. *et al.* Reduced humoral immune response after BNT162b2 coronavirus disease 2019 messenger RNA vaccination in cancer patients under antineoplastic treatment. **ESMO open**, v. 6, n. 5, p. 100274, 2021.

PELLERIN, Laurence et al. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. **Immunologic research**, v. 58, n. 2, p. 358-368, 2014.

PEREZ-ANDRES, Martin et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78, n. S1, p. S47-S60, 2010.

POST, Nathan et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. **PloS one**, v. 15, n. 12, p. e0244126, 2020.

PRUD'HOMME, Gerald J.; GLINKA, Yelena. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. **Oncotarget**, v. 3, n. 9, p. 921, 2012.

QIN, Chuan et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China; *Clinical Infectious Diseases*; Oxford Academic. **Clinical Infectious Diseases**, 2020.

RAO, Tadimeti S. *et al.* Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-741, 1993.

REVENFELD, Anne Louise Schacht et al. Presence of HLA-DR Molecules and HLA-DRB 1 mRNA in Circulating CD 4+ T Cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 84, n. 4, p. 211-221, 2016.

RIZZOLIO, Sabrina; TAMAGNONE, Luca. Multifaceted role of neuropilins in cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 23, p. 3563-3575, 2011.

ROBILOTTI, Elizabeth V. *et al.* Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. **Nature medicine**, v. 26, n. 8, p. 1218-1223, 2020.

ROQUILLY, Antoine; MINTERN, Justine D.; VILLADANGOS, Jose A. Spatiotemporal Adaptations of Macrophage and Dendritic Cell Development and Function. **Annual Review of Immunology**, v. 40, p. 525-557, 2022.

RUAN, Qiurong et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

RUGGE, Massimo; ZORZI, Manuel; GUZZINATI, Stefano. SARS-CoV-2 infection in the Italian Veneto region: adverse outcomes in patients with cancer. **Nature Cancer**, v. 1, n. 8, p. 784-788, 2020.

- SAICHI, Melissa et al. Single-cell RNA sequencing of blood antigen-presenting cells in severe COVID-19 reveals multi-process defects in antiviral immunity. **Nature Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 538-551, 2021.
- SAMPATH, Pavithra et al. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1726, 2018.
- SAMUDRALA, Pavan Kumar et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European journal of pharmacology**, v. 883, p. 173375, 2020.
- SANCHEZ-CERRILLO, Idefonso et al. Differential redistribution of activated monocyte and dendritic cell subsets to the lung associates with severity of COVID-19. **MedRxiv**, 2020.
- SCHÄFER, Sarah; ZERNECKE, Alma. CD8+ T cells in atherosclerosis. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020.
- SCHÖNRICH, Günther; RAFTERY, Martin J. The PD-1/PD-L1 axis and virus infections: a delicate balance. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 207, 2019.
- SCHULTE-SCHREPPING, Jonas et al. Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1419-1440. e23, 2020.
- SHAH, Vallari et al. Poor outcome and prolonged persistence of SARS-CoV-2 RNA in COVID-19 patients with haematological malignancies; King's College Hospital experience. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 5, p. e279, 2020.
- SHANG, Jian et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11727-11734, 2020.
- SHARAFELDIN, Noha et al. Outcomes of COVID-19 in patients with cancer: report from the National COVID Cohort Collaborative (N3C). **Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 20, p. 2232-2246, 2021.
- SHI, Jianzhong et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. **Science**, v. 368, n. 6494, p. 1016-1020, 2020.
- SILVIN, Aymeric et al. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1401-1418. e18, 2020.

SONG, Yun et al. Tr1 cells as a key regulator for maintaining immune homeostasis in transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 671579, 2021.

SOSA-HERNANDEZ, Victor A. et al. B cell subsets as severity-associated signatures in COVID-19 patients. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 611004, 2020.

SPINETTI, Thibaud et al. Reduced monocytic human leukocyte antigen-DR expression indicates immunosuppression in critically ill COVID-19 patients. **Anesthesia and analgesia**, v. 131, n. 4, p. 993, 2020.

STRIOGA, Marius; PASUKONIENE, Vita; CHARACIEJUS, Dainius. CD8+ CD28– and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. **Immunology**, v. 134, n. 1, p. 17-32, 2011.

SUN, Dan et al. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. **World Journal of Pediatrics**, v. 16, n. 3, p. 251-259, 2020.

SUN, Lova; WARNER, Jeremy L.; PARIKH, Ravi B. Immune responses to SARS-CoV-2 among patients with cancer: what can seropositivity tell us?. **JAMA oncology**, v. 7, n. 8, p. 1123-1125, 2021.

TAN, Li *et al.* Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2020.

TARTARONE, Alfredo; LEROSE, Rosa. COVID-19 and cancer care: what do international guidelines say?. **Medical Oncology**, v. 37, n. 9, p. 1-5, 2020.

TAVAKOLPOUR, Soheil *et al.* Lymphopenia during the COVID-19 infection: What it shows and what can be learned. **Immunology letters**, v. 225, p. 31, 2020.

TEMPLETON, Arnoud J. et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 6, 2014.

THAKKAR, Astha *et al.* Seroconversion rates following COVID-19 vaccination among patients with cancer. **Cancer cell**, v. 39, n. 8, p. 1081-1090. e2, 2021.

UDDIN, Mohammed *et al.* SARS-CoV-2/COVID-19: viral genomics, epidemiology, vaccines, and therapeutic interventions. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 526, 2020.

VAN EIJK, Larissa E. *et al.* COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options. **The Journal of pathology**, v. 254, n. 4, p. 307-331, 2021.

VIJENTHIRA, Abi *et al.* Outcomes of patients with hematologic malignancies and COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 3377 patients. **Blood**, v. 136, n. 25, p. 2881-2892, 2020.

WALLS, Alexandra C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WALTER, Laura O. *et al.* The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2-infected subjects: A cross-sectional study. **Immunology**, v. 165, n. 4, p. 481-496, 2022a.

WALTER, Laura Otto. **Resposta imune dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2: um estudo transversal**. 2022. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022b.

WAN, Suxin *et al.* Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). **MedRxiv**, 2020.

WANG, Feng *et al.* The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. **JCI insight**, v. 5, n. 10, 2020.

WANG, Mei-Yue *et al.* SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 587269, 2020.

WANG, Yifei *et al.* The role of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1507, 2021.

WANG, Zhongliang *et al.* Clinical features of 69 cases with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 769-777, 2020.

WONG, Lok-Yin Roy; PERLMAN, Stanley. Immune dysregulation and immunopathology induced by SARS-CoV-2 and related coronaviruses—*are we our own worst enemy?*. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 1, p. 47-56, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). COVID-19 clinical management: living guidance. 25 January 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338882>. Acesso em: 03/06/2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Who Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/> Acesso em 29/06/2022.

WU, Chaomin *et al.* Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 7, p. 934-943, 2020.

- WU, Huang-Pin et al. Effect of interleukin-17 on in vitro cytokine production in healthy controls and patients with severe sepsis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 12, p. 1250-1257, 2015.
- YAN, Juming; SMYTH, Mark J.; TENG, Michele WL. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 10, n. 7, p. a028530, 2018.
- YANG, Li *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2020.
- YE, Qing; WANG, Bili; MAO, Jianhua. The pathogenesis and treatment of the Cytokine Storm in COVID-19. **Journal of infection**, v. 80, n. 6, p. 607-613, 2020.
- YOUNG, Barnaby E. et al. Viral dynamics and immune correlates of coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. e2932-e2942, 2021.
- ZENARRUZABEITIA, Olatz et al. T cell activation, highly armed cytotoxic cells and a shift in monocytes CD300 receptors expression is characteristic of patients with severe COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 655934, 2021.
- ZENG, Hanyu et al. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. **Cellular & molecular immunology**, v. 12, n. 5, p. 566-571, 2015.
- ZHANG, Wei et al. Lymphocyte may be a reference index of the outcome of cancer patients with COVID-19. **Aging (Albany NY)**, v. 13, n. 6, p. 7733, 2021.
- ZHAO, Xuesen et al. Broad and differential animal angiotensin-converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2. **Journal of virology**, v. 94, n. 18, p. e00940-20, 2020.
- ZHAO, Yan et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. **JCI insight**, v. 5, n. 13, 2020.
- ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.
- ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZHOU, Runhong et al. Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864-877. e5, 2020.

ZHOU, Zhou; ZHU, Yimiao; CHU, Ming. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

**APÊNDICE A - Análise das células imunes circulantes em sangue periférico por citometria de fluxo.**

**Análise do Tubo 1**

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem Neoplasia	P
Leucócitos/ mm3	6315,00 (4670,00 – 9620,00) <b>a</b>	7470,00 (490,00 – 48510,00) <b>a,b</b>	9165,00 (4520,00 – 20400,00) <b>b</b>	0,042
Neutrófilos (%leucócitos)	60,94 (44,42 - 77,25 ) <b>a</b>	83,34 (14,71 - 96,56) <b>b</b>	75,00 (58,39 - 92,27) <b>b</b>	<0,001
Neutrófilos/mm3	3845,10 (2328,59 - 6320,34) <b>a</b>	5266,07 (125,29 - 46166,96) <b>a,b</b>	6286,13 (3094,16 - 17583,78) <b>b</b>	0,005
Monócitos (%Le)	7,31 (4,45 - 11,14 ) <b>a</b>	3,71 (0,10 - 10,58 ) <b>b</b>	6,54 (3,48 - 9,55) <b>a,b</b>	0,003
Monócitos/mm3	454,46 (283,00 -948,01)	383,78 (18,22 -1496,70 )	532,44 (276,20 -1644,51)	<b>0,104</b>
Eosinófilos (%Le)	1,94 (0,36 – 8,70) <b>a</b>	0,13 (0,00 – 7,89 ) <b>b</b>	0,61 (0,05 – 3,94) <b>b</b>	0,001
Eosinófilos/mm3	107,70 (22,03 - 544,62) <b>a</b>	10,44 (0,00 - 937,05) <b>b</b>	56,52 (3,92 - 678,46) <b>b</b>	0,001
Basófilos (%Le)	0,60 (0,25 – 1,36 ) <b>a</b>	0,21 (0,01 - 1,55) <b>b</b>	0,19 (0,01 - 0,61) <b>b</b>	<0,001
Basófilos/mm3	38,34 (15,30 - 86,76) <b>a</b>	8,50 (0,50 - 431,73) <b>b</b>	13,64 (0,48 - 50,77) <b>b</b>	0,001
Linfócitos totais/mm3	2020,00 (1358,00 – 3350,00) <b>a</b>	1005,00 (310,00 – 1600,00) <b>b</b>	1735,00 (330,00 – 3710,00) <b>a</b>	<0,001
Linfócitos totais (%Le)	27,65 (12,14 - 45,25) <b>a</b>	6,05 (0,33 - 74,31) <b>b</b>	18,06 (2,28 - 34,52) <b>b</b>	0,002
Linfo T (%Le)	15,47 (8,84 - 34,69) <b>a</b>	3,90 (0,22 – 60,27) <b>b</b>	12,72 (1,41 - 23,07) <b>a,b</b>	0,017
Linfo T/mm3	1006,93 (643,89 - 2133,43) <b>a</b>	572,01 (11,02 -1276,08) <b>b</b>	952,81 (160,74 - 2325,96) <b>a</b>	0,001
Linfo TCD4 (%Le)	9,39 (4,15 - 19,55 )	2,43 (0,08 - 32,77)	8,53 (0,80 – 12,51)	<b>0,075</b>
Linfo TCD4/mm3	609,90 (341,96 - 1550,09) <b>a</b>	338,63 (4,00 - 713,09) <b>b</b>	657,85 (90,88 - 1243,11) <b>a</b>	0,005
Linfo TCD8 (%Le)	5,08 (2,36 - 13,65) <b>a</b>	1,37 (0,12 - 27,25) <b>b</b>	3,29 (0,52 – 11,69) <b>a,b</b>	0,006
Linfo TCD8/mm3	334,52 (150,56 -839,47) <b>a</b>	181,88 (6,01 - 484,28) <b>b</b>	225,80 (59,64 - 1178,85) <b>a,b</b>	0,001
Linfo T GD (%Le)	0,83 (0,07 – 2,66) <b>a</b>	0,11 (0,00 – 3,70) <b>b</b>	0,24 (0,05 – 0,82) <b>b</b>	<0,001
Linfo T GD/mm3	59,26 (4,06 - 153,48) <b>a</b>	11,61 (0,00 – 79,18) <b>b</b>	34,00 (5,68 - 75,60) <b>b</b>	<0,001
Linfo T DP (%Le)	0,11 (0,04 – 1,10) <b>a</b>	0,03 (0,00 – 0,29) <b>b</b>	0,07 (0,01 – 0,33) <b>a,b</b>	0,011
Linfo T DP/mm3	6,47 (2,49 - 71,06) <b>a</b>	2,71 (0,00 - 10,85) <b>b</b>	5,34 (0,78 - 41,82) <b>a,b</b>	0,001

Linfo T DN (%Le)	0,11 (0,03 – 0,26) <b>a</b>	0,03 (0,00 – 0,57) <b>b</b>	0,08 (0,01 – 0,33) <b>a,b</b>	0,033
Linfo T DN/mm3	6,95 (1,96 – 17,31) <b>a</b>	3,18 (0,00 – 8,34) <b>b</b>	9,77 (1,70 – 33,76) <b>a</b>	0,001
Linfo B (%Le)	3,21 (1,14 – 10,71) <b>a</b>	0,56 (0,01 – 3,35) <b>b</b>	2,39 (0,39 – 5,95) <b>a,b</b>	<0,001
Linfo B/mm3	223,62 (72,76 – 622,25) <b>a</b>	81,30 (0,04 – 196,79) <b>b</b>	195,15 (44,87 – 490,87) <b>a</b>	<0,001
Linfo B mad (%Le)	2,68 (1,05 – 6,08) <b>a</b>	0,46 (0,00 – 3,21) <b>b</b>	2,31 (0,25 – 5,94) <b>a</b>	<0,001
Linfo B mad/mm3	191,89 (60,90 – 367,15) <b>a</b>	72,92 (0,00 – 145,53) <b>b</b>	177,11 (40,32 – 490,05) <b>a</b>	<0,001
Plasmablasts (%Le)	0,02 (0,00 – 0,06) <b>a</b>	0,06 (0,00 – 0,72) <b>b</b>	0,06 (0,01 – 0,59) <b>b</b>	0,001
Plasmablasts/mm3	1,21 (0,00 – 4,94) <b>a</b>	3,58 (0,00 – 75,24) <b>a,b</b>	6,22 (0,75 – 61,20) <b>b</b>	<0,001
NK (%Le)	5,34 (1,22 – 12,46) <b>a</b>	1,19 (0,06 – 15,44) <b>b</b>	2,07 (0,30 – 3,88) <b>b</b>	<0,001
NK/mm3	317,88 (100,52 – 768,14) <b>a</b>	120,05 (3,00 – 349,34) <b>b</b>	121,07 (34,08 – 380,91) <b>b</b>	<0,001
NK 56++ (%Le)	0,15 (0,02 – 0,53) <b>a</b>	0,03 (0,00 – 0,38) <b>b</b>	0,07 (0,01 – 0,12) <b>b</b>	0,005
NK CD56++/mm3	9,88 (1,23 – 31,80)	4,14 (0,00 – 58,63)	8,21 (0,73 – 17,22)	0,194
NKT (%Le)	0,89 (0,29 – 4,29)	0,56 (0,01 – 3,08)	0,61 (0,17 – 4,05)	0,314
NKT/mm3	57,98 ( 17,63 – 375,75)	60,10 (0,50 – 230,74)	61,41 (29,00 – 698,27)	0,695
Relação TCD4/TCD8	1,69 (0,77 – 4,13)	1,54 (0,66 – 3,14)	2,31 (0,70 – 4,89)	0,364
Relação N/L	2,21 (0,98 – 6,29) <b>a</b>	13,91 (0,19 – 292,60) <b>b</b>	4,15 (1,69 – 40,46) <b>b</b>	0,001
Monócitos CD56+	5,92 (1,14 – 20,16) <b>a</b>	14,28 (3,03 – 93,74) <b>b</b>	12,85 (2,07 – 48,15) <b>b</b>	0,001

## Análise do Tubo 2

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
TCD4 N (%TCD4+)	28,60 (17,29 – 55,34)	33,39 (3,73 – 91,31)	25,66 (1,31 – 36,31)	0,098
TCD4 N/mm3	203,61 (86,77 – 465,64) <b>a</b>	91,88 (0,69 – 651,12) <b>b</b>	144,01 (3,15 – 303,22) <b>a,b</b>	0,004
TCD4 CM (%TCD4+)	40,03 (17,48 – 57,09)	35,59 (0,14 – 48,98)	37,07 (3,55 – 64,26)	0,244
TCD4 CM/mm3	276,14 (141,30 – 485,48) <b>a</b>	95,93 (0,99 – 304,91) <b>b</b>	200,96 (8,54 – 798,89) <b>a,b</b>	<0,001
TCD4 EM (%TCD4+)	26,59 (14,05 – 55,75)	24,07 (0,08 – 52,10)	26,61 (16,13 – 68,49)	0,502
TCD4 EM/mm3	173,48 (76,18 – 893,84) <b>a</b>	59,75 (0,57 – 353,79) <b>b</b>	173,46 (21,07 – 305,20) <b>a</b>	0,001
TCD4 EMRA (%TCD4+)	3,75 (0,66 – 17,42) <b>a</b>	8,01 (1,41 – 18,27) <b>a,b</b>	11,96 (0,51 – 34,15) <b>b</b>	0,032
TCD4 EMRA/mm3	26,73 (5,46 – 104,86)	16,77 (0,30 – 73,26)	60,25 (3,03 – 200,86)	0,069

TCD8 N (%TCD8+)	21,33 (8,73 – 48,78)	22,99 (4,02 – 64,14)	16,41 (4,29 – 34,82)	0,285
TCD8 N/mm3	84,57 (32,78 – 452,31) <b>a</b>	31,76 (0,62 – 135,98) <b>b</b>	44,69 (2,78 – 266,95) <b>b</b>	0,001
TCD8 CM (%TCD8+)	13,05 (4,37 – 33,17)	11,50 (0,20 – 37,71)	7,36 (2,29 – 27,61)	0,227
TCD8 CM/mm3	48,71 (15,01 – 208,94) <b>a</b>	14,62 (0,81 – 91,14) <b>b</b>	18,53 (3,25 – 197,57) <b>b</b>	<0,001
TCD8 EM (%TCD8+)	31,33 (8,60 – 61,15)	27,07 (0,04 – 55,91)	36,63 (11,28 – 66,09)	0,357
TCD8 EM/mm3	116,91 (29,54 – 340,18) <b>a</b>	33,18 (0,16 – 232,06) <b>b</b>	81,18 (24,40 – 450,38) <b>a,b</b>	0,001
TCD8 EMRA (%TCD8+)	30,60 (5,91 – 68,63)	35,33 (11,53 – 71,06)	37,63 (13,05 – 67,30)	0,512
TCD8 EMRA/mm3	127,51 (32,89 – 344,68) <b>a</b>	51,11 (1,19 – 289,55) <b>b</b>	94,19 (27,67 – 326,35) <b>a,b</b>	0,007
TCD4 DR+ (%TCD4+)	7,45 (3,13 – 34,76)	10,45 (1,22 – 32,02)	6,65 (4,10 – 17,39)	0,509
TCD4 DR+/mm3	56,70 (21,23 – 351,97) <b>a</b>	27,94 (1,05 – 132,83) <b>b</b>	39,65 (14,46 – 138,73) <b>a,b</b>	0,018
TCD8 DR+ (%TCD8+)	19,09 (6,70 – 52,54)	27,18 (8,30 – 54,77)	20,32 (7,37 – 54,32)	0,227
TCD8 DR+/mm3	79,60 (21,25 – 277,68) <b>a</b>	41,62 (3,29 – 146,44) <b>b</b>	56,12 (13,12 – 261,34) <b>a,b</b>	0,023
Monócitos CD62L+	70,04 (33,45 – 86,55)	87,61 (5,95 – 98,04)	62,63 (8,45 – 96,72)	0,094
Neutrófilos CD62L+	69,69 (32,76 – 93,31) <b>a</b>	94,94 (42,21 – 99,47) <b>b</b>	75,46 (41,26 – 98,75) <b>a,b</b>	0,001

### Análise do Tubo 3

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
TCD4 CD28+CD57- (% TCD4+)	97,35 (52,12 – 99,94)	93,52 (68,13 – 99,98)	93,21 (78,87 – 99,70)	0,294
TCD4 CD28+CD57- /mm3	665,60 (402,45 – 1177,46) <b>a</b>	327,03 (3,74 – 696,98) <b>b</b>	568,26 (74,34 – 1171,51) <b>a</b>	<0,001
TCD4 CD28-CD57- (% TCD4+)	2,64 (0,06 – 47,88)	3,30 (0,01 – 9,97)	1,61 (0,05 – 15,16)	0,088
TCD4 CD28-CD57- /mm3	20,24 (0,42 – 767,66) <b>a</b>	7,09 (0,01 – 60,11) <b>b</b>	9,17 (0,12 – 132,05) <b>b</b>	0,006
TCD4 CD28-CD57+ (% TCD4+)	2,08 (0,03 – 45,60)	2,63 (0,01 – 21,90)	3,92 (0,21 – 19,67)	0,398
TCD4 CD28-CD57+ /mm3	17,33 (0,21 – 731,10)	7,22 (0,01 – 132,05)	21,78 (1,81 – 143,05)	0,291
TCD8 CD28+CD57- (% TCD8+)	63,61 (37,71 – 89,46)	55,36 (34,58 – 82,50)	61,19 (24,21 – 87,86)	0,692
TCD8 CD28+CD57- /mm3	227,68 (136,61 – 650,85) <b>a</b>	106,26 (4,95 – 272,50) <b>b</b>	162,55 (14,43 – 627,38) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57- (% TCD8+)	36,38 (10,54 – 62,29) <b>a</b>	14,04 (0,11 – 44,74) <b>b</b>	11,40 (0,14 – 53,87) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57- /mm3	181,43 (36,20 – 494,72) <b>a</b>	18,34 (0,23 – 182,30) <b>b</b>	26,82 (0,31 – 246,49) <b>b</b>	<0,001
TCD8 CD28-CD57+ (% TCD8+)	20,30 (3,03 – 47,86)	24,67 (0,83 – 55,11)	24,24 (2,66 – 52,57)	0,383
TCD8 CD28-CD57+ /mm3	83,92 (12,92 – 366,00) <b>a</b>	35,88 (0,34 – 135,84) <b>b</b>	44,87 (5,98 – 304,97) <b>a,b</b>	0,026

### Análise do Tubo 4

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
Treg total (%TCD4+)	3,55 (1,52 – 6,31) <b>a</b>	5,00 (0,56 – 32,11) <b>a</b>	1,67 (0,49 – 7,28) <b>b</b>	0,005
Treg total/mm3	24,59 (10,83 – 80,97) <b>a</b>	12,58 (0,40 – 108,74) <b>a,b</b>	6,26 (1,64 – 90,49) <b>b</b>	0,002
Treg N (%TCD4+)	1,23 (0,27 – 3,11) <b>a</b>	1,02 (0,04 – 31,83) <b>a,b</b>	0,26 (0,01 – 2,27) <b>b</b>	0,003
Treg N/mm3	8,81 (2,52 – 21,54) <b>a</b>	2,03 (0,01 – 107,79) <b>b</b>	2,03 (0,03 – 10,29) <b>b</b>	<0,001
Treg M (%TCD4+)	2,02 (0,85 – 5,27)	2,63 (0,11 – 10,94)	1,31 (0,42 – 6,88)	<b>0,128</b>
Treg M/mm3	14,45 (5,47 – 67,63) <b>a</b>	8,13 (0,39 – 27,23) <b>b</b>	4,42 (1,59 – 85,52) <b>b</b>	0,003
CD4+ CD25+ (%TCD4+)	7,39 (4,30 – 10,59) <b>a</b>	10,66 (4,91 – 87,48) <b>b</b>	7,97 (3,60 – 37,47) <b>a,b</b>	0,028
CD4+ CD25+ /mm3	51,33 (25,88 – 125,89)	38,59 (0,63 – 296,27)	41,62 (9,24 – 288,27)	<b>0,724</b>
CD8+ CD25+ (%TCD8+)	1,60 (0,27 – 7,80) <b>a</b>	18,17 (0,56 – 97,94) <b>b</b>	0,53 (0,11 – 71,43) <b>a</b>	0,002
CD8+ CD25+ /mm3	5,43 (1,65 – 47,25)	13,61 (0,46 – 207,64)	0,95 (0,17 – 431,62)	<b>0,067</b>

### Análise do Tubo 5

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
Pré-CG/naive	59,38 (29,27 – 87,23)	52,05 (9,18 – 82,48)	66,94 (23,99 – 85,74)	<b>0,453</b>
Pré-CG/naive/mm3	152,47 (40,99 – 499,98) <b>a</b>	68,99 (0,99 – 141,59) <b>b</b>	109,46 (21,83 – 382,10) <b>a</b>	0,001
Naive	55,28 (27,25 – 80,35)	51,17 (9,08 – 79,94)	57,66 (22,00 – 80,84)	<b>0,474</b>
Naive/mm3	134,51 (37,93 – 430,77) <b>a</b>	68,45 (0,99 – 139,20) <b>b</b>	108,06 (18,92 – 339,93) <b>a</b>	0,001
Transicional	5,51 (1,83 – 13,91) <b>a</b>	0,88 (0,09 – 20,51) <b>b</b>	4,75 (0,48 – 12,16) <b>a,b</b>	0,014
Transicional/mm3	12,51 (3,06 – 69,21) <b>a</b>	0,53 (0,00 – 25,78) <b>b</b>	8,75 (1,20 – 51,28) <b>a,b</b>	<0,001
NS-MBC	16,91 (2,95 – 41,70) <b>a</b>	4,83 (1,10 – 27,20) <b>b</b>	9,35 (2,06 – 23,15) <b>b</b>	0,001
NS-MBC/mm3	37,49 (3,50 – 160,38) <b>a</b>	3,05 (0,66 – 39,58) <b>b</b>	15,40 (5,77 – 29,82) <b>b</b>	<0,001
CS	21,53 (8,35 – 49,16)	15,31 (6,85 – 54,89)	19,34 (9,05 – 48,39)	<b>0,316</b>
CS/mm3	56,39 (10,59 – 173,39) <b>a</b>	14,23 (0,59 – 34,70) <b>b</b>	47,09 (10,04 – 116,68) <b>a</b>	<0,001
CS-MBC	19,29 (7,71 – 47,49)	11,86 (5,93 – 49,12)	15,03 (5,16 – 39,78)	<b>0,103</b>
CS-MBC/MM3	49,84 (10,11 – 158,36) <b>a</b>	11,89 (0,37 – 30,06) <b>b</b>	37,77 (7,20 – 92,38) <b>a</b>	<0,001
CS 27-	2,39 (0,40 – 7,18) <b>a</b>	3,19 (0,92 – 8,58) <b>a,b</b>	4,75 (1,57 – 10,40) <b>b</b>	0,001
CS 27-/mm3	6,07 (0,47 – 24,31) <b>a</b>	2,55 (0,21 – 7,97) <b>b</b>	9,31 (2,44 – 34,36) <b>a</b>	<0,001

Plasmablastos	0,63 (0,00 – 3,84) <b>a</b>	13,53 (0,51 – 46,02) <b>b</b>	3,41 (0,33 – 19,52) <b>b</b>	<0,001
Plasmablastos/mm3	1,74 (0,00 – 12,80) <b>a</b>	4,28 (0,31 – 108,81) <b>a,b</b>	6,16 (0,51 – 40,23) <b>b</b>	0,012

### Análise do Tubo 6

Variável	Controle	Neoplasia e COVID-19	COVID-19 sem neoplasia	P
Neutrófilos mad (%Le)	55,79 (39,57 – 72,87) <b>a</b>	73,75 (14,83 – 98,16) <b>b</b>	68,06 (49,06 – 88,96) <b>b</b>	0,001
Neutrófilos mad/mm3	3525,95 (2186,26 – 6169,30) <b>a</b>	5217,33 (112,25 – 35877,99) <b>a,b</b>	5650,88 (2715,61 – 14996,04) <b>b</b>	0,004
Neutrófilos imat (%Le)	0,13 (0,02 – 0,68) <b>a</b>	0,27 (0,01 – 20,11) <b>a,b</b>	0,42 (0,02 – 5,98) <b>b</b>	0,007
Neutrófilos imat/mm3	8,72 (1,22 – 56,03) <b>a</b>	15,02 (0,44 – 9755,36) <b>a,b</b>	37,07 (1,51 – 1219,92) <b>b</b>	0,007
Basófilos (%Le)	0,61 (0,23 – 1,27) <b>a</b>	0,20 (0,00 – 1,81) <b>b</b>	0,23 (0,00 – 0,64) <b>b</b>	<0,001
Basófilos/mm3	41,58 (14,07 – 81,02)	6,00 (0,00 – 446,29)	16,42 (0,00 – 91,80)	<b>0,047</b>
Neutro maduro %neutro	99,78 (99,06 – 99,95) <b>a</b>	99,49 (78,63 – 99,99) <b>a,b</b>	99,35 (92,47 – 99,97) <b>b</b>	0,005
Neutro imaturo %neutro	0,22 (0,05 – 0,94) <b>a</b>	0,51 (0,01 – 21,37) <b>a,b</b>	0,64 (0,03 – 7,53) <b>b</b>	0,005
mono total %	6,94 (3,76 – 9,69) <b>a,b</b>	3,50 (0,29 – 10,45) <b>a</b>	7,44 (4,40 – 8,77) <b>b</b>	0,002
mono total / mm3	441,65 (281,44 – 739,95) <b>a</b>	405,97 (16,66 – 1499,57) <b>a</b>	583,56 (363,07 – 1750,32) <b>b</b>	0,009
cMO %	5,75 (3,16 – 8,67) <b>a,b</b>	3,41 (0,23 – 9,59) <b>a</b>	6,64 (4,11 – 7,88) <b>b</b>	0,004
cMO %mono	84,63 (75,59 – 92,42) <b>a</b>	89,47 (75,60 – 98,03) <b>a,b</b>	89,73 (82,66 – 97,83) <b>b</b>	0,010
cMO/mm3	363,11 (238,09 – 683,09) <b>a</b>	335,79 (15,82 – 1376,16) <b>a</b>	514,88 (324,03 – 1578,96) <b>b</b>	0,005
iMO %	0,39 (0,22 – 0,68)	0,15 (0,03 – 1,16)	0,48 (0,15 – 1,03)	<b>0,085</b>
iMO %mono	5,56 (3,61 – 9,22)	8,30 (1,54 – 16,83)	6,62 (2,14 – 12,16)	<b>0,590</b>
iMO/mm3	26,09 (14,23 – 41,32)	18,27 (0,29 – 114,80)	35,19 (18,09 – 177,36)	<b>0,133</b>
ncMO %	0,60 (0,19 – 1,25) <b>a</b>	0,04 (0,00 – 0,38) <b>b</b>	0,11 (0,00 – 0,82) <b>b</b>	<0,001
ncMO %mono	9,23 (2,07 – 17,47) <b>a</b>	1,61 (0,00 – 19,64) <b>b</b>	1,69 (0,03 – 10,31) <b>b</b>	<0,001
ncMO/mm3	37,73 (15,65 – 80,09) <b>a</b>	6,42 (0,00 – 31,73) <b>b</b>	10,75 (0,00 – 57,45) <b>b</b>	<0,001
TIMAS %	1,00 (0,46 – 1,86) <b>a</b>	0,24 (0,03 – 1,54) <b>b</b>	0,82 (0,16 – 1,31) <b>a,b</b>	0,001
TIMAS % MONO	15,37 (7,58 – 24,41) <b>a</b>	10,53 (1,97 – 24,40) <b>a,b</b>	10,26 (2,17 – 17,34) <b>b</b>	0,010
TIMAS MM3	64,43 (34,74 – 112,60) <b>a</b>	29,21 (0,44 – 123,41) <b>b</b>	44,09 (18,79 – 222,13) <b>a,b</b>	0,029

HLA-DR Mono	(10137,13 (3099,94 - 27788,00)	(5028,99 (808,75 - 17142,88)	(8975,39 (1205,99 - 35106,90)	<b>0,060</b>
HLA-DR cMos	9852,00 (2701,23 - 18734,22) <b>a</b>	4573,73 (346,98 - 15988,40) <b>b</b>	8597,20 (1084,96 - 34220,07) <b>a,b</b>	0,010
HLA-DR iMos	20547,49 (4095,82 - 42651,44)	13854,43 (3718,79 - 74561,71)	16011,43 (3096,65 - 62022,56)	<b>0,416</b>
HLA-DR ncMos	13054,77 (5597,31 - 29060,58) <b>a</b>	5915,94 (2176,32 - 34107,44) <b>b</b>	10889,87 (1528,39 - 26181,12) <b>a,b</b>	0,026
HLA-DR TIMAS	15824,14 (6289,47 - 29529,78)	8390,55 (3880,20 - 74561,71)	15240,65 (2937,77 - 39602,03)	<b>0,449</b>
HLA-DR I/C	2,11 (0,70 – 3,76) <b>a,b</b>	3,67 (1,05 – 15,42) <b>a</b>	1,83 (0,81 – 3,80) <b>b</b>	0,022
HLA-DR NC/C	1,43 (0,90 – 2,52)	1,93 (0,00 – 11,09)	1,35 (0,76 – 3,42)	<b>0,644</b>
HLA-DR TIMAS/C	1,67 (1,07 – 2,78)	3,00 (0,77 – 15,42)	1,69 (0,82 – 3,78)	<b>0,052</b>
DC total %	0,31 (0,16 – 0,62) <b>a</b>	0,02 (0,01 – 0,67) <b>b</b>	0,15 (0,01 – 0,37) <b>b</b>	<0,001
DC total / mm3	19,82 (10,35 – 39,12) <b>a</b>	3,37 (0,39 – 14,33) <b>b</b>	13,56 (0,97 – 42,21) <b>a</b>	<0,001
mDC %	0,21 (0,11 – 0,56) <b>a</b>	0,02 (0,01 – 0,57) <b>b</b>	0,10 (0,01 – 0,32) <b>b</b>	<0,001
mDC %DC	70,37 (45,42 – 90,00) <b>a</b>	86,83 (39,58 – 100,00) <b>b</b>	81,59 (55,51 – 97,27) <b>b</b>	0,001
mDC/mm3	13,17 (7,11 – 35,33) <b>a</b>	2,83 (0,39 – 12,19) <b>b</b>	9,19 (0,97 – 33,47) <b>a</b>	<0,001
pDC %	0,09 (0,04 – 0,18) <b>a</b>	0,00 (0,00 – 0,21) <b>b</b>	0,02 (0,00 – 0,09) <b>b</b>	<0,001
pDC %DC	29,63 (10,00 – 54,58) <b>a</b>	13,16 (0,00 – 60,42) <b>b</b>	18,41 (2,73 – 44,07) <b>b</b>	0,001
pDC/mm3	5,90 (2,89 – 10,57) <b>a</b>	0,00 (0,00 – 8,35) <b>b</b>	2,74 (0,00 – 9,12) <b>b</b>	<0,001
mDC/pDC	2,37 (0,83- 9,00) <b>a</b>	5,73 (0,65 – 28,23) <b>a,b</b>	4,45 (1,25 – 35,63) <b>b</b>	0,003
pDC/mDC	0,42 (0,11 – 1,20) <b>a</b>	0,15 (0,00 – 1,52) <b>b</b>	0,22 (0,02 – 0,79) <b>b</b>	0,001

## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Análises Clínicas

Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar do projeto de pesquisa intitulado: **Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte** conduzido pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cláudia Santos da Silva da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução CNS nº466/12.

#### QUAL A JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DESTE ESTUDO?

A doença COVID-19 é uma infecção que ocorre nos pulmões e é causada pelo novo coronavírus, chamado de SARS-CoV-2. Enquanto que a maioria das pessoas com COVID-19 apresenta apenas a forma leve da doença, uma parcela desenvolve uma doença respiratória grave. Acredita-se que o aumento da gravidade da COVID-19, bem como o bloqueio do seu desenvolvimento esteja relacionada à proteção individual da pessoa infectada. Sabe-se que o coronavírus descontrola a proteção contra o vírus, o que pode atrasar a produção de anticorpos (defesa) contra o vírus e levar a piora da doença, que pode atingir vários órgãos, principalmente os pulmões. Além disso, não se sabe até o momento se os anticorpos (defesa) produzidos contra o coronavírus pelos infectados é capaz de evitar novas infecções. Dessa forma, a realização de estudos para acompanhar e avaliar as mudanças que naturalmente acontecerão na resposta de pacientes com COVID-19 com o passar do tempo poderá auxiliar no entendimento de como a doença se desenvolve, o que pode auxiliar no tratamento dos pacientes. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar o comportamento da resposta imune em pacientes com COVID-19 quando aparece a doença, e depois, após 2, 6 e 12 meses, para ver se as mudanças de comportamento nessa resposta podem auxiliar na determinação da gravidade da doença.

#### QUAIS OS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO?

Após o(a) Senhor(a) concordar em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), serão coletados tubos de seu sangue. Além disso, o(a) Senhor(a) será contatado depois de 2, 6 e 12 meses pelos pesquisadores para realizar novas coletas de sangue e realização de exames. Sempre que possível, essas coletas de sangue serão realizadas com outras que o(a) Senhor(a) tenha que realizar devido a infecção por coronavírus. Após a coleta dos tubos de sangue, eles serão encaminhados ao laboratório de pesquisa, onde o sangue será utilizado para realizar os testes que avaliam algumas células ou proteínas envolvidas na resposta do seu sistema imune. Adicionalmente, será consultado o seu prontuário

médico para coletarmos outras informações de interesse para o estudo, como resultados de exames de laboratório e tomografia computadorizada de tórax.

### **EU TENHO QUE PARTICIPAR? QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA?**

Cabe ao Senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, isso não afetará de maneira nenhuma o padrão de cuidados que o(a) Senhor(a) receberá. Se decidir participar, o(a) Senhor(a) precisa assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mesmo após ter assinado, é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para o(a) Senhor(a). Duas vias deste documento serão rubricadas e assinadas pelo(a) Senhor(a) e pelo pesquisador. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa. Pode ser que o(a) Senhor(a) não tenha nenhum benefício direto com o estudo. No entanto, com a conclusão deste trabalho, espera-se identificar exames de laboratório que auxiliem a determinar o prognóstico de pessoas com COVID-19, e compreender melhor a dinâmica da resposta imune ao coronavírus. Acredita-se que tal conhecimento auxiliará na forma como os médicos tratarão futuros pacientes, bem como facilitará ao governo brasileiro na tomada de decisões em políticas públicas relacionadas à COVID-19.

### **EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?**

Não existem riscos importantes relacionados, pode ocorrer apenas com os procedimentos de coleta de sangue. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: a coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e por equipe treinada. A equipe estará presente durante os procedimentos de coleta e tomará todos os cuidados necessários para que o (a) Senhor(a) tenha o mínimo de desconforto, apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. Será assegurado o direito do(a) Senhor(a) não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados/resultados obtidos serão armazenados codificados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

### **O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS MEUS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?**

As informações obtidas serão mantidas em sigilo e utilizadas exclusivamente para os fins desta pesquisa. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Seu anonimato será mantido quando da divulgação dos resultados nos meios científicos, pois os dados apresentados não incluirão nomes de pessoas, ou seja, apenas divulgaremos resultados obtidos como um todo. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

### **QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?**

Não há despesas previstas para o(a) Senhor(a) em qualquer fase do estudo. Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, o(a) Senhor(a) não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer, o(a) Senhor(a) será ressarcido(a). Em qualquer momento, se sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, o(a) Senhor(a) terá direito a indenização.

### **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?**

Os pesquisadores são pessoas com quem você deve contar, no caso de dúvidas sobre o estudo ou sobre os seus direitos como participante. Quaisquer informações adicionais sobre a pesquisa, em qualquer momento, poderão ser solicitadas à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Cláudia Santos da Silva, do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (ACL/CCS/UFSC). A sua sala fica localizada no 2º piso do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), ao lado do Núcleo Desenvolver - CEP 88040-970 - Florianópolis – SC. Seus dados de contato são: (48) 37212071; e-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br.

Em caso de dúvidas relacionadas aos procedimentos éticos da pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dados para contato com o CEPSH-UFSC: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Universidade Federal de Santa Catarina - Prédio Reitoria II - Rua: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC - CEP: 88.040-400 - Contato: (48) 3721-6094 ou cep.propesq@contato.ufsc.br

### **Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo “**Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte**”.

Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

---

Nome do participante/CPF

Assinatura

Data

ou

---

Responsável legal/CPF

Assinatura

Data

---

Responsável pelo estudo/CPF

Assinatura

Data

## APÊNDICE C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-CoV-2, UM ESTUDO DE COORTE

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31124820.1.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.059.832

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa de grupo de pesquisadores, não apresentado como proposta de tese, dissertação ou TCC, sob coordenação da professora Marica Cláudia Santos da Silva do Departamento de Análises Clínicas/CCS/UFSC. Estudo de coorte prospectivo, com 300 participantes.

**Crterios de incluso:** individuos com 18 anos ou mais, com suspeita de COVID-19, no periodo de agosto de 2020 a julho de 2021, e que assinaram ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

**Crterios de exclusão:** gestantes, pacientes vivendo com HIV e pacientes oncológicos.

**Intervenções:** Coleta de amostras de sangue, questionário e consulta a prontuários.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Investigar, por meio de um estudo de coorte, o comportamento das células circulantes do sistema imune, dos anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, das citocinas plasmáticas e dos mediadores inflamatórios como biomarcadores de prognóstico em indivíduos infectados por SARS-CoV-2.

**Objetivo Secundário:** a. Avaliar por até 12 meses, em indivíduos infectados por SARS-CoV-2, os

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400

**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 4.059.832

seguintes parâmetros: - As frequências absolutas e relativas de populações celulares circulantes em sangue periférico, tais como subtipos de células T, B e NK, células dendríticas (DCs), monócitos e neutrófilos; As concentrações plasmáticas de citocinas como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 p70, IL-17A, IFN- e TNF -; - As concentrações dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM, IgG e IgA no plasma; - O comportamento da carga viral de SARS-CoV-2; - As concentrações de óxido nítrico (NOx) e a atividade de mieloperoxidase (MPO) plasmáticas. b. Investigar as possíveis correlações entre as populações celulares no sangue circulante, as citocinas plasmáticas, a carga viral, a produção de anticorpos específicos, os mediadores inflamatórios e demais exames laboratoriais nos grupos investigados. c. Verificar se há associação entre cada uma das análises laboratoriais propostas anteriormente com o desfecho clínico dos pacientes ao longo do estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Análise adequada dos riscos e benefícios.

Riscos: Não existem riscos importantes relacionados aos pacientes, pode ocorrer apenas com os procedimentos de coleta de sangue. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: a coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e por equipe treinada. A equipe estará presente durante os procedimentos de coleta e tomará todos os cuidados necessários para que o paciente tenha o mínimo de desconforto, apesar disso, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. Será assegurado o direito do paciente não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados/resultados obtidos serão armazenados codificados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

Benefícios: O participante não terá um benefício direto com o estudo. No entanto, com a conclusão deste trabalho, espera-se identificar exames de laboratório que auxiliem a determinar o prognóstico de pessoas com COVID-19, e compreender melhor a dinâmica da resposta imune ao coronavírus. Acredita-se que tal conhecimento auxiliará na forma como os médicos tratarão futuros pacientes, bem como facilitará ao governo brasileiro na tomada de decisões em políticas públicas relacionadas à COVID-19.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários adicionais.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 4.059.832

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável e pelo diretor do CCS/UFSC.

Consta autorização institucional, nos termos da resolução 466/12, assinada pela Gerente de Ensino e Pesquisa/HU/UFSC/EBSERH.

Foram apresentados os instrumentos para coleta dos pacientes e dos prontuários.

O TCLE foi reajustado e contempla os itens obrigatórios da resolução 466/12.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as pendências e inadequações foram resolvidas, encaminha-se o projeto para aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1545802.pdf	27/05/2020 17:11:06		Aceito
Outros	Questionario_coleta_dados.pdf	27/05/2020 17:10:37	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_covid_revisado.pdf	27/05/2020 17:05:03	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Outros	Respostas_pendencias_assinado.pdf	27/05/2020 17:04:15	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoccs.pdf	28/04/2020 13:59:11	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Declaração de concordância	Ciencia_Instituicao.pdf	25/04/2020 11:48:28	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Maria_Claudia_Santos_Silva_enfrentam ento_COVID_19.pdf	25/04/2020 11:42:36	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-8094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 4.059.832

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 31 de Maio de 2020

---

**Assinado por:**  
**Maria Luiza Bazzo**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** csp.propesq@contato.ufsc.br

HOSPITAL GOVERNADOR  
CELSO RAMOS/ SMS -  
FLORIANÓPOLIS - SC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** RESPOSTA IMUNE DOS PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-CoV-2, UM ESTUDO DE COORTE

**Pesquisador:** Maria Cláudia Santos da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 31124820.1.3001.5360

**Instituição Proponente:** SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.289.382

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda com a seguinte justificativa: "Na casuística do projeto Resposta Imune dos Pacientes Infectados pelo SARS-CoV-2, Um Estudo de Coorte, apreciado e aprovado pelo CEP/SH/UFSC (CAAE: 31124820.1.0000.0121) está descrito que serão incluídos no estudo indivíduos com mais de 18 anos com suspeita de COVID-19 de hospitais e Unidades de Pronto Atendimento (UPA) de Florianópolis, no período de agosto de 2020 a julho de 2021, e que assinarem ao termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Assim, apesar das orientações para condução de pesquisas e atividade dos CEP durante a pandemia provocada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (COVID-19)\* da CONEP, no item 2.1.2, informar que nos casos de protocolos de pesquisa que possuam "centros participantes" e/ou "centros coparticipantes", não deverá ser realizada nova análise ética pelos respectivos CEP vinculados e devido ao caráter excepcional adotado, os CEP referendarão o parecer de aprovado, quando for o caso, emitido pela CONEP, solicitando a inclusão do Hospital Nereu Ramos como coparticipante deste projeto."

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda: solicitar a inclusão do Hospital Nereu Ramos como coparticipante deste projeto.

**Endereço:** Rua Irmã Benwarda, 297 - 8º andar  
**Bairro:** Centro **CEP:** 88.015-270  
**UF:** SC **Município:** FLORIANÓPOLIS  
**Telefone:** (48)3251-7036 **E-mail:** cephgr@saude.sc.gov.br

HOSPITAL GOVERNADOR  
CELSO RAMOS/ SMS -  
FLORIANÓPOLIS - SC



Continuação do Parecer: 4.289.362

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Já avaliados na submissão ao CEP/SH/UFSC

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Apresentados projeto original, TCLE e formulários institucionais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Novo documento incluído: Carta de aceite institucional assinada pela Diretora do Hospital Nereu Ramos.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O CEP/SH/UFSC tomou conhecimento da emenda e recomenda sua aprovação.

O CEP HGCR tomou conhecimento da emenda e procede sua aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Emenda_Inclusao_Declaracao_assinado.pdf	26/08/2020 15:08:07	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Outros	Questionario_coleta_dados.pdf	27/05/2020 17:10:37	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_covid_revisado.pdf	27/05/2020 17:05:03	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Outros	Respostas_pendencias_assinado.pdf	27/05/2020 17:04:15	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Maria_Claudia_Santos_Silva_enfrentamento_COVID_T9.pdf	25/04/2020 11:42:36	Maria Cláudia Santos da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Irmã Benedita, 297 - 8º andar  
Bairro: Centro CEP: 88.015-270  
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
Telefone: (48)3251-7038 E-mail: cephgcr@saude.sc.gov.br

HOSPITAL GOVERNADOR  
CELSO RAMOS/ SMS -  
FLORIANÓPOLIS - SC



Continuação do Parecer: 4.289.382

FLORIANÓPOLIS, 21 de Setembro de 2020

---

Assinado por:  
Carla Pauli  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Irmã Benwarda, 297 - 8º andar  
Bairro: Centro CEP: 88.015-270  
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS  
Telefone: (48)3251-7036 E-mail: ceptrgr@saude.sc.gov.br

## APÊNDICE D – Questionário para coleta de dados dos pacientes

<b>Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2</b>		
<b>Dados de identificação e contato</b>		
1. Nome:		
2. Número do prontuário:		
3. Data da avaliação: ____ / ____ / ____		
4. Data de nascimento: ____ / ____ / ____		
5. Telefone residencial: (____)		
6. Telefone celular: (____)		
7. Outro telefone de contato 1: (____)		
<b>Características sócias demográficas</b>		
8. Idade: ____ anos		
9. Peso		
10. Altura		
11. Sexo:		
(1) Feminino		
(2) Masculino		
12. Cor da pele/raça (conforme observado pelo pesquisador):		
(1) Branca		
(2) Parda		
(3) Negra		
(4) Amarela		
(5) Indígena		
(6) IGN		
<b>Comorbidades</b>		
<i>Algum médico já disse que o senhor (a) tem ou teve:</i>		
<b>(Complementar com dados do prontuário)</b>		
13. Pressão alta	(0) Não	(1) Sim
14. Diabetes	(0) Não	(1) Sim
15. Asma	(0) Não	(1) Sim
16. Enfisema ou bronquite crônica (DPOC)	(0) Não	(1) Sim
17. Tuberculose	(0) Não	(1) Sim
18. Infarto do miocárdio	(0) Não	(1) Sim
19. Derrame (AVC)	(0) Não	(1) Sim
20. Colesterol alto	(0) Não	(1) Sim
21. Insuficiência cardíaca congestiva (ICC)	(0) Não	(1) Sim
22. Doença autoimune	(0) Não	(1) Sim
23. Depressão	(0) Não	(1) Sim
Outros:		
<b>Medicações (complementar com dados do prontuário)</b>		
<b><i>O senhor (a) faz uso de medicações regulares?</i></b>		
24.	(0) Não	(1) Sim
Se sim, quais?		
<b>Hábitos de vida - Tabagismo</b>		
25. O Sr. (a) fuma ou já fumou?		
(1) Nunca fumei		
(2) Já fumei, mas parei		

(3) Ainda fumo		
<b>Tabagismo atual</b>		
26. Há quantos anos o Sr. (a) começou a fumar? _____ anos		
27. Quantos cigarros o Sr. (a) usa em média por dia? _____ cigarros		
28. Há quantos anos o Sr. (a) parou de fumar completamente? _____		
29. Por quantos anos o Sr. (a) teve o hábito de fumar? _____ anos		
30. Quantos cigarros o Sr. (a) usava em média por dia? _____ cigarros		
<b>Período da infecção – informações clínicas</b>		
31. Febre	(0) Não	(1) Sim
32. Tosse com expectoração (diferente da habitual)	(0) Não	(1) Sim
33. Dores no corpo	(0) Não	(1) Sim
34. Dor de garganta	(0) Não	(1) Sim
35. Dor de cabeça	(0) Não	(1) Sim
36. Perda de paladar	(0) Não	(1) Sim
37. Perda de olfato	(0) Não	(1) Sim
Outros:		

Fonte: Walter, 2022b.