



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio
Prudente

Área de Oncologia

**DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA IMUNE
NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO NOVO
CORONAVÍRUS (SARS-CoV-2) EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS COM NEOPLASIAS
HEMATOLÓGICAS OU TUMORES SÓLIDOS.**

Apresentação Final

Pós-Graduando: Flávio Pignataro Oshiro

Nível: Doutorado

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-Orientadora: Dr^a Marjorie Vieira Batista

Co-Orientadora: Dr^a Amanda Braga de Figueiredo

São Paulo, 2024

**DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA IMUNE NA
EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO NOVO
CORONAVÍRUS (*SARS-CoV-2*) EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS COM NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS
OU TUMORES SÓLIDOS.**

FLÁVIO PIGNATARO OSHIRO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-orientadora: Dr^a Marjorie Vieira Batista

Co-orientadora: Dr^a Amanda Braga de Figueiredo

São Paulo

2024

Oshiro, Flávio Pignataro.

Determinação do papel da resposta imune na evolução da infecção pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes oncológicos com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos.. / Flávio Pignataro Oshiro. São Paulo, 2024.

154f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Kenneth John Gollob.

1. SARS-CoV-2, 2. Gravidade da COVID-19, 3. Câncer

CDU 616

Nome: Flávio Pignataro Oshiro

Título do Trabalho: Determinação do papel da resposta imune na evolução da infecção pelo novo coronavírus (*SARS-CoV-2*) em pacientes oncológicos com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos.

Aprovado em: 16/05/2024

Banca Examinadora

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Co-orientadora: Dr^a Marjorie Vieira Batista

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Co-orientadora: Dr^a Amanda Braga de Figueiredo

Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein

Membro da Banca: Dr. Guilherme de Paula Costa

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto

Membro da Banca: Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da Banca: Dr. Sergio Costa Oliveira

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da Banca: Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Instituição: Universidade de São Paulo

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento de número 2020/16736-0; do *National Cancer Institute – National Institutes of Health* (NCI – NHI) em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento de número 5R01CA246368-02; e por uma doação da empresa NIVEA (Alemanha) ao A.C.Camargo Cancer Center.

Além do suporte financeiro, agradeço ao apoio institucional oferecido pelo A.C.Camargo Cancer Center, pela Fundação Antônio Prudente, e pelo Hospital Israelita Albert Einstein.

“Mas tudo na imunologia ‘depende’?” – Pergunta feita por uma estudante durante uma monitoria da disciplina de Imunologia Básica, há muitos anos.

*Dedico este trabalho às pessoas que passaram pela pandemia de COVID-19.
Àquelas que resistiram, e, especialmente, às que não resistiram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar às pessoas que atuaram como participantes de pesquisa neste projeto, por seu altruísmo em um momento de tamanha incerteza. Também às suas famílias pelo apoio prestado aos seus parentes, mesmo quando a proximidade física em si teve de ser evitada ao máximo. Meus sinceros sentimentos a quem perdeu seus entes queridos em um contexto tão doloroso e complexo.

Agradeço às pessoas envolvidas neste projeto, desde aquelas que escreveram suas primeiras versões e fizeram as submissões, mas também aquelas que estiveram em contato com os participantes de pesquisa, que realizaram o primeiro processamento das amostras, e as que trouxeram suas ideias e opiniões para melhorar a qualidade desta tese.

Dentre elas, agradeço em especial a Kenneth John Gollob, não apenas pela orientação e apoio durante anos de trabalho, mas especialmente por sua essência enquanto ser humano. Poucos possuem tamanha capacidade de enxergar, entender e se colocar no lugar do próximo. Essas qualidades, em especial num supervisor de doutorado, tornam o processo tranquilo e prazeroso, o que nos dá a oportunidade de aproveitar ao máximo as vantagens e desafios inerentes à pesquisa.

Também agradeço a orientação dada pela Marjorie Vieira Batista, especialmente por suas primeiras observações dos dados do trabalho, que o modificaram de forma extremamente importante para que conseguíssemos chegar às conclusões que chegamos. A experiência de uma pessoa diretamente envolvida com o cuidado ao paciente trouxe a visão que, pessoalmente, eu não conseguiria ter.

Agradeço à Amanda Braga de Figueiredo, que não apenas me informou sobre a possibilidade de realizar o doutorado em São Paulo e participou ativamente de minha supervisão, mas também fez um excelente trabalho – como de costume – para garantir o ótimo funcionamento do laboratório. O fato de poder executar protocolos tão bem construídos, de alguém em quem tenho plena confiança no trabalho, me trouxe a tranquilidade de saber que não atravessaríamos grandes barreiras nos quesitos técnicos – como não atravessamos.

Agradeço às minhas queridas “*Amorinhas*”, as enfermeiras de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center. Não à toa, meu carinho e admiração por vocês – que já era grande antes de conhecê-las – apenas cresceu ao longo desses anos. Sou imensamente grato por seu trabalho, que tornou o meu significativamente mais simples. Mas também agradeço imensamente por sua dedicação, carinho e confiança. Em especial, cito as enfermeiras

Amanda França de Nóbrega, Amanda Stephanie de Sousa, Bruna Tirapelli Gonçalves, Cassia da Silva, Fernanda Araújo Pintor, Iara Monique Messias, Juliana de Oliveira Souza, Lais Corsino Durant, Laís Lie Senda de Abrantes, Larissa Kuil, Luciana Facure Moredo, e Vanessa da Silva Alves, que participaram ativamente deste projeto, em especial em 2020, onde o que mais se entendia sobre a COVID-19 era o medo. Por esse mesmo motivo, estendo meus agradecimentos às equipes clínicas que estiveram na linha de frente, independentemente de atuarem diretamente neste projeto. Também estendo meus agradecimentos às demais *Amorinhas*, sejam aquelas que já não estão mais na instituição, ou aquelas que chegaram após as coletas deste projeto terem encerrado. Não poderia deixar de destacar a Lais Corsino Durant e a Juliana de Oliveira Souza, por tamanha paciência lidando comigo em tantos projetos. Por isso, deixo aqui o meu “muito obrigadinho!”.

Agradeço às técnicas do A.C.Camargo Cancer Center, que fizeram o primeiro processamento das amostras de sangue utilizadas neste trabalho. Mais uma vez, a sua participação durante momentos de incerteza tornou o meu trabalho não apenas mais simples, mas também mais seguro. Em especial, cito as técnicas Ana Paula Mitsue, Bruna Barros, Gabriela Branco, Katia Klug Oliveira, e Louise de Carvalho Mota.

Estendo os agradecimentos às equipes clínicas que trabalharam ativamente com o cuidado dos pacientes e estiveram envolvidas neste trabalho, em especial à Bianca Grassi de Miranda, Diego Feriani da Silva, Flávia de Azevedo Abrantes, Ivan Leonardo França, Jayr Schmidt Filho, Juliana Framil, Marcela Goldner, Rachel Riechelmann, e Rodrigo Reghini da Silva.

Agradeço também à Walderez Ornelas Dutra, não apenas pelas orientações e dicas inestimáveis, mas também por seu apoio e incentivo em todos os momentos. Me sinto privilegiado por ter a oportunidade de lhe conhecer e acompanhar um pouco do seu trabalho. Também me sinto igualmente admirado tanto pela pessoa fora do laboratório, quanto pela pesquisadora.

Nesse mesmo sentido, cito Eloísa Ribeiro Olivieri e Giovana Torrezan, que disponibilizaram seu tempo para me ajudar e direcionar em minhas escolhas profissionais.

Agradeço a orientação e direcionamento dados tanto por Niels Olsen Saraiva Câmara quanto Vladimir Cordeiro de Lima. Ao mesmo tempo, os peço desculpas não apenas por tantos relatórios e reuniões de avaliação, mas principalmente pela baixa qualidade do texto em suas versões iniciais. Meus agradecimentos vão especialmente por sua capacidade de trazer críticas construtivas ao trabalho, de uma forma que me incentivou a buscar por mais conhecimento e tornar esta tese mais interessante e completa. Estendo esses agradecimentos

aos demais membros da banca de doutorado, Guilherme de Paula Costa, José Alexandre Barbuto, Jean Pierre Peron, Sergio Costa, e Samantha de Souza Ribeiro por sua disponibilidade, prestatividade, e pelas contribuições para a melhoria desta tese.

Agradeço às pessoas do Laboratório de Imuno-Oncologia Translacional, sejam as da “versão A.C.Camargo”, ou da “versão Einstein”. Cada contribuição direta durante o projeto, além das dicas, incentivo e opiniões dadas ao longo de tantas reuniões contribuíram muito para a qualidade do trabalho. Agradeço em especial à Clara Maciel Cavalcanti, que me ajudou muito nos experimentos e no aprendizado da citometria de fluxo. À Katia Luciano Pereira Morais, que me ajudou a realizar os experimentos de dosagens de marcadores imunes solúveis, mas também esteve ao meu lado em inúmeros momentos de dúvidas. Por fim, à Nayane Alves de Lima Galdino, que tanto me auxiliou e me acolheu quando cheguei em São Paulo, e que agora não pode mais se livrar de mim!

Mas também estendo meus agradecimentos a Alexandre Chaves, Amanda Rondinelli, Ananda Lopes, Arianne Gusmão, Gabriela Kinker, Glauco Vitiello, Guilherme Ferreira, Juliana Apostolico, Luísa Côrtes, Pedro Henrique Barbosa, Raísa de Sá, e Rogério Bordini, por contribuições dentro e fora do laboratório. Em especial, cito Dálete Barcelos, Letícia Rodrigues e Thaís Romano, às quais agradeço a amizade, carinho, e tamanha possibilidade de aprendizado.

Agradeço em especial às pessoas que me acompanham há muitos anos. Em primeiro lugar, à minha querida amiga Bárbara Ramos Souza, cujo apoio nunca cessa, mesmo em meio a tantas dificuldades e desafios. Você há mais de dez anos é como um porto seguro para mim. Alguém com quem posso sempre contar e confiar, mesmo para as ideias mais duvidosas. Queria ter mais alcance para te ajudar, mas sempre terei uma gratidão eterna por você enquanto pessoa, e por tudo o que já fez por mim.

Também à minha querida psicóloga, Marana Duarte Avelar, que por tantas vezes esteve por perto, tentando me manter de pé. Foram quatro anos longos e desafiadores, onde muitas vezes não estive em condições de ajudar a mim mesmo, ou tornar meus processos de cura menos dolorosos. Sei que você se manteve por perto para muito além do que a profissão te exigiria, de forma semelhante ao que fez por minha família. Agradeço por todo o empenho, paciência e carinho ao longo desses anos.

Agradeço à Fernanda Terra, que me acolheu com tanto carinho quanto a distância permite, me incentivando e aconselhando em tantas decisões, sempre deixando as portas abertas para que eu pudesse ter em quem me apoiar. À Cássia Araújo, cujo carinho inegável por mim parece ser, também, perene. À Dani Murta, Fernanda Drummond, Hellen Campos,

Ingriddy Moreira, Luana Carvalho, Luciana da Fonseca Medeiros, Matheus Marques, e Raquel de Sávio, que torcem constantemente por mim, e que têm a minha constante torcida. À minha família, que me ajudou a me estabelecer em São Paulo. À Elizete, que sempre me tratou com o carinho de uma mãe. À Miriã Gusmão, que esteve comigo em momentos de grande dúvida, me aconselhando e trazendo perspectivas que eu não conseguiria por mim mesmo. À Taynara Carolina Lima, que acreditou em meu trabalho e potencial desde que nos conhecemos. À Nayara Yukari, que sempre me estendeu a mão, não importa quanta dor a rodeasse. Aos rapazes do servidor de *Rising Forces Online*, que me deram a oportunidade de aprender sobre liderança e trabalho em equipe, e me proporcionaram uma válvula de escape necessária. À Marina Pavanello, que, com seus abraços, me trouxe a sensação de estar de volta a Ouro Preto. À Tábata Takahashi França, que me tratou com tanto carinho, cordialidade e prestatividade já nas minhas primeiras tentativas de encontrar os caminhos após o doutorado. E à Fernanda Leme, por ser ela mesma. Poder ver a sua espontaneidade de perto foi um grande presente para mim, que guardarei com carinho.

RESUMO

Oshiro FP. **Determinação do papel da resposta imune na evolução da infecção pelo novo coronavírus (*SARS-CoV-2*) em pacientes oncológicos com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos.** Tese. São Paulo. Fundação Antônio Prudente; 2024.

A pandemia de COVID-19 trouxe grandes preocupações quanto ao manejo de pessoas nos grupos de risco. Esse é o caso de pacientes com câncer, onde existe uma lacuna de conhecimento quanto à influência da resposta imunológica em diferentes desfechos da COVID-19. No presente trabalho investigamos os perfis imunes de pacientes oncológicos com diferentes apresentações clínicas da COVID-19, durante a primeira fase da pandemia, no ano de 2020. A partir das técnicas de citometria de fluxo multiparamétrica e ensaios de dosagem de citocinas circulantes, observamos respostas imunes distintas entre pacientes com diferentes desfechos da COVID-19. Observamos que indivíduos com tumores hematológicos e COVID-19 leve apresentaram boa produção de anticorpos e presença de células T regulatórias. Por outro lado, pacientes com tumores hematológicos que vieram a óbito devido à COVID-19 apresentaram fortes indícios da escassez de células T, exaustão de linfócitos, baixa produção de anticorpos, e concentração exacerbada de diversos mediadores imunes no plasma. Entre pacientes com tumores sólidos, observamos poucas diferenças na resposta humoral, mas padrões de resposta imunológica celular com um claro gradiente entre regulação e exaustão de células imunes. Enquanto pacientes que tiveram COVID-19 leve apresentaram baixa ativação de linfócitos e a presença de células T regulatórias de memória, o padrão para pacientes com COVID-19 grave foi marcado pela ativação e/ou exaustão celular. Pacientes que se recuperaram da COVID-19 grave apresentaram um amplo perfil de células NK ativadas, mas também populações com grande potencial de regulação imunológica. Já os que faleceram em decorrência da COVID-19 grave sofreram com o rompimento das redes de regulação, além dos efeitos decorrentes do amplo perfil de exaustão entre diversas populações de linfócitos. Por fim, nossas análises ainda indicaram que a quimiocina CXCL8 é um potencial marcador para a predição do desfecho da COVID-19 entre pacientes oncológicos de forma geral.

Palavras-chave: *SARS-CoV-2*. Gravidade da COVID-19. Câncer. Perfil Imune Humoral. Perfil Imune Celular.

ABSTRACT

Oshiro FP. **Determinação do papel da resposta imune na evolução da infecção pelo novo coronavírus (*SARS-CoV-2*) em pacientes oncológicos com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos.** Tese. São Paulo. Fundação Antônio Prudente; 2024.

The COVID-19 pandemic has raised great concerns regarding the management of people in risk groups. This is the case for cancer patients, where there is a gap in knowledge regarding the influence of the immune response on different outcomes of COVID-19. In the present work, we investigated the immune profiles of cancer patients with different clinical presentations of COVID-19 during the first phase of the pandemic, in 2020. Using multiparametric flow cytometry techniques and circulating cytokine detection assays, we observed different immune responses between patients with different COVID-19 outcomes. We observed that patients with hematological tumors and mild COVID-19 presented good antibody production and the presence of regulatory T cells. On the other hand, patients with hematological tumors who died showed strong evidence of a shortage of T cells, exhaustion of lymphocytes, antibody production impairment, and an exacerbated concentration of several immune mediators in the plasma. Among patients with solid tumors, we observed few differences regarding humoral responses, but cellular immune responses had a clear gradient between regulation and activation exhaustion of immune cells. While patients who had mild COVID-19 showed low lymphocyte activation and the presence of memory regulatory T cells, the pattern for patients with severe COVID-19 was marked by cellular activation and/or exhaustion. Patients who recovered from severe COVID-19 showed a broad profile of activated NK cells, in addition to populations with great potential for immune regulation. Meanwhile, those who died because of severe COVID-19 suffered from the disruption of regulatory networks, and the effects of a broad exhaustion profile among different lymphocyte populations. Finally, our analyzes indicated that the chemokine CXCL8 is a potential marker for predicting the outcome of COVID-19 among cancer patients in general.

Keywords: *SARS-CoV-2*. COVID-19 Severity. Cancer. Humoral Immune Profile. Cellular Immune Profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de recrutamento de pacientes e utilização das amostras do presente estudo.....	31
Figura 2 – Estratégia de análise utilizada para a seleção de eventos destinados às análises não-supervisionadas.....	37
Figura 3 – Estratégia de análise supervisionada para a investigação das principais populações de linfócitos.....	39
Figura 4 – Estratégia de análise supervisionada para a investigação de subpopulações específicas de linfócitos.....	41
Figura 5 – Desenho experimental utilizado neste projeto.....	45
Figura 6 – Caracterização epidemiológica da coorte de pacientes deste estudo.....	47
Figura 7 – Detalhes sobre as características clínicas, momento de coleta de sangue e progressão da COVID-19 na coorte de pacientes oncológicos deste estudo.....	49
Figura 8 – Análise de fatores bioquímicos e hematológicos indica associação entre baixas contagens de subpopulações de leucócitos e o desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores hematológicos.....	51
Figura 9 – Pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19 que apresentaram concentrações elevadas de mediadores imunes no plasma tiveram maior chance de óbito.....	53
Figura 10 – Pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19 não apresentaram alterações nas dosagens de IFN-γ ou IL-12A, independentemente da gravidade da doença.....	56
Figura 11 – Pacientes com tumores hematológicos e COVID-19 apresentaram baixa produção de anticorpos contra proteínas do <i>SARS-CoV-2</i> antes da progressão da doença.....	59

Figura 12 – Avaliação não supervisionada dos dados de citometria indica subpopulações de células B diferencialmente expressas entre pacientes com tumores sólidos.....	63
Figura 13 – Análise dos dados de citometria de fluxo revela que pacientes com tumores hematológicos que apresentaram COVID-19 leve possuem frequências elevadas de células B ativadas e diferenciadas.....	66
Figura 14 – Avaliação supervisionada dos dados de citometria de fluxo indica três perfis distintos de subpopulações de linfócitos entre pacientes com tumores sólidos e diferentes apresentações clínicas da COVID-19.....	69
Figura 15 – Fatores imunes solúveis e celulares foram os principais determinantes do desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores hematológicos.....	74
Figura 16 – Fatores imunes solúveis e celulares foram os principais determinantes do desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos.....	77
Figura 17 – Análises de correlação indicam que a resposta humoral ineficiente está associada ao óbito entre pacientes com tumores hematológicos.....	80
Figura 18 – Análises de correlação indicam que a falta de regulação imune eficiente se associa ao óbito entre pacientes com tumores sólidos.....	84
Figura 19 – Modelos de Florestas Randômicas e de Curvas ROC indicam CXCL8 como um potencial preditor de morte para pacientes oncológicos infectados pelo <i>SARS-CoV-2</i>.....	88
Figura 20 – Os desfechos morte e recuperação estão associados a diferentes perfis imunes entre pacientes oncológicos.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de anticorpos utilizados para os ensaios de citometria de fluxo.....	35
Tabela 2 – Características clínicas e demográficas da coorte de pacientes deste trabalho.....	46
Tabela 3 – Dicionário dos marcadores de citometria de fluxo utilizados neste trabalho.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC: Área sob a curva (do inglês *Area Under the Curve*).

BATF: Fator de transcrição semelhante ao ATF com zíper de leucina básica (do inglês *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor*).

BSA: Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine Seric Albumin*).

Célula CAR: Referente às células com receptor quimérico de antígeno (do inglês *Chimeric Antigen Receptor Cells*).

Célula NK: Célula exterminadora natural (do inglês *Natural Killer Cells*).

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019 (do inglês *Coronavirus Disease-2019*).

CSF2 ou GM-CSF: Fator estimulador de colônia 2 ou Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (do inglês *Colony-Stimulating Factor 2* ou *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*).

CSF3 ou G-CSF: Fator estimulador de colônia 3 ou Fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês *Colony-Stimulating Factor 3* ou *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*).

FGF2: Fator 2 de crescimento de fibroblastos (do inglês *Fibroblast Growth Factor 2*).

GATA3: Proteína 3 de ligação ao GATA (do inglês *GATA Binding Protein 3*).

H1N1: Diz respeito à cepa de vírus Influenza A.

IC: Intervalo de Confiança.

IFN: Interferon.

Ig: Imunoglobulina (do inglês *Immunoglobulin*).

IL: Interleucina (do inglês *Interleukin*).

IL-1RN: Receptor antagonista da interleucina 1 (do inglês *Interleukin-1 Receptor Antagonist*).

IRF4: Fator 4 de regulação do interferon (do inglês *Interferon Regulatory Factor 4*).

LPS: Lipopolissacarídeo

MERS-CoV: Coronavírus associado à síndrome respiratória do Oriente Médio (do inglês *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*).

NCI: Referente ao instituto nacional do câncer dos Estados Unidos da América (do inglês *National Cancer Institute*).

NF- κ B: Fator nuclear *kappa* B (do inglês *Nuclear Factor-kappa B*).

PBS: Salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate-Buffered Saline*).

PCA: Análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*).

PCR: Proteína C Reativa.

PDGFB: Fator de crescimento B derivado de plaquetas (do inglês *Platelet-Derived Growth Factor B*).

PPAR γ : Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*).

RBD: Domínio de ligação ao receptor (do inglês *Receptor-Binding Domain*).

ROC: Referente à curva “característica de operação do receptor” (do inglês *Receiver Operating Characteristic curve*).

ROR γ t: Receptor órfão gama relacionado ao RAR (do inglês *RAR-related Orphan Receptor Gamma*).

RPMI: Meio de cultivo de células do Instituto Memorial Roserwell Park (do inglês *Rosewell Park Memorial Institute Medium*).

RT qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*).

SARS-CoV: Coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus*).

SARS-CoV-2: Coronavírus 2 associado à síndrome respiratória aguda grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2*).

STAT6: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 6*).

T-bet: Caixa T expressa em células T (do inglês *T-box Expressed in T Cells*).

TGF- β : Fator de transformação e crescimento beta (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*).

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumor Necrosis Factor Alpha*).

UTI: Unidade de Tratamento Intensivo.

VEGFA: Fator A de crescimento endotelial vascular (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor A*).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	TUMORES E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	20
1.2	INFECÇÕES VIRAIS E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	21
1.2.1	Imunidade Pulmonar	22
1.3	<i>CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19)</i>.....	23
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.1.1	Objetivos Específicos	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	RECRUTAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE PACIENTES.....	30
3.2	DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO POR <i>SARS-CoV-2</i>.....	32
3.3	AVALIAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIO ELETRÔNICO	32
3.4	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS	32
3.5	QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS PRESENTES NO PLASMA	33
3.6	ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO	33
3.7	ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DOS DADOS DE CITOMETRIA.....	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4.	RESULTADOS.....	45
4.1	EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DA COORTE	45
4.2	DETERMINANTES INDICATIVOS DE ÓBITO ENTRE PACIENTES ONCOLÓGICOS	50
4.3	INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNES DA COVID-19 EM PACIENTES ONCOLÓGICOS.....	79
4.4	PREDIÇÃO DO DESFECHO DA COVID-19 EM PACIENTES ONCOLÓGICOS	87
5.	DISCUSSÃO.....	91

5.1	ASPECTOS COMUNS DA RESPOSTA IMUNE FRENTE AO <i>SARS-CoV-2</i> EM PACIENTES ONCOLÓGICOS.....	91
5.2	PERFIL DOS PACIENTES COM TUMORES HEMATOLÓGICOS E COVID-19	94
5.3	PERFIL DOS PACIENTES COM TUMORES SÓLIDOS E COVID-19.....	100
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	 Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	121
	Apêndice 1 – Matrizes de Correlação – coorte de pacientes com tumores hematológicos	131
	Apêndice 2 – Matrizes de Correlação – coorte de pacientes com tumores sólidos	133
	Apêndice 3 – Artigo Publicado	136

1. INTRODUÇÃO

Muito embora o sistema imunológico seja reconhecido principalmente por sua função na defesa do organismo, suas influências excedem essa capacidade, estando também envolvido em diversos processos de reparo tecidual, crescimento e remodelamento de tecidos e órgãos. Curiosamente, o sistema imunológico também pode exercer forte influência tanto no controle quanto na exacerbação de doenças, sejam elas causadas ou não por patógenos.

1.1 TUMORES E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O câncer é uma das doenças que geralmente não estão relacionadas a patógenos. Ela pode ser definida pelas alterações genéticas que resultam na desregulação do crescimento celular. Essas alterações são comumente causadas de forma espontânea ou por fatores ambientais, como danos oriundos de agentes físicos, químicos ou biológicos, mas também por influências epigenéticas. Tais fatores afetam genes e proteínas associadas à regulação da proliferação e diferenciação celular, iniciando o processo de transformação maligna¹⁻⁴.

O comportamento tumoral varia de acordo com o tipo de neoplasia – hematológica ou de órgãos sólidos – e de cada tipo celular e órgão afetado. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), os tumores hematológicos são cânceres que se iniciam em tecidos formadores do sangue ou em células do sistema imunológico, enquanto tumores sólidos podem ser definidos como massas de tecido que usualmente não contém cistos ou líquidos, representando as demais neoplasias^{5,6}. Na prática, a classificação tumoral é definida com base em características morfológicas e genéticas, o que resulta em diferentes conclusões quanto ao seu manejo clínico. A classificação de tumores sólidos leva em consideração o grau de diferenciação das células, suas características morfológicas, taxa de crescimento e, em alguns casos, alterações genéticas e epigenéticas. Nesse sentido, tumores de uma mesma topografia anatômica podem apresentar características biológicas e clínicas distintas^{1,2}. Sendo assim, tumores são caracterizados por sua grande heterogeneidade, devido aos seus atributos específicos^{7,8}.

Além disso, tumores diferentes são tratados como entidades distintas, ainda que compartilhem as características de autossuficiência aos sinais de crescimento, resistência a sinais de inibição do crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, promoção de angiogênese, capacidade de invasão tecidual e metastatização, reprogramação de vias metabólicas, e capacidade de evasão do sistema imunológico^{4,8}.

No contexto das neoplasias, o sistema imune pode tanto estar envolvido em processos

de eliminação tumoral quanto no seu desenvolvimento³. Essa dicotomia varia de acordo com diversos fatores, entre eles o metabolismo, microambiente, microbiota, e diversos tipos de células, sejam elas não-tumorais, as do sistema imunológico, ou as do estroma tumoral. Dentre os fatores imunes com reconhecida influência na biologia e comportamento tumoral, estão o Fator A de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFA), o Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos (FGF2), o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFB), o Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (CSF2), o Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos (CSF3), as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL5 e CXCL8 (também referida como IL-8) e as interleucinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12A, IL-13, IL-15, IL-17A, IFN- γ e TNF α ^{3,4,9-12}. O papel desses fatores varia de acordo com o desenvolvimento tumoral, sendo, portanto, dependente do contexto temporal e do próprio microambiente¹⁰.

Sendo assim, trabalhos que avaliam a resposta imunológica entre populações oncológicas com diferentes tipos de tumores devem levar em consideração a grande variabilidade decorrente de cada tipo tumoral, para além de outros fatores ainda emergentes, mas com significativa importância na resposta imune. O mesmo pode ser dito para estudos que envolvem a resposta imunológica entre pacientes infectados por patógenos, onde é possível observar grupos de indivíduos com perfis imunes distintos.

1.2 INFECÇÕES VIRAIS E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

De forma semelhante ao que ocorre no câncer, o sistema imunológico também possui participação ambígua dependendo da forma como os processos infecciosos se dão, podendo tanto influenciar mecanismos de resolução quanto de exacerbação da doença. Tratando especificamente das respostas antivirais, a atuação do sistema imunológico ocorre tanto de forma direta quanto indireta, mas com grande participação de células que não são consideradas do sistema imunológico¹³.

As respostas antivirais são baseadas em grande parte na ação de defensinas e citocinas do tipo interferon. Essas citocinas são capazes de induzir o estado antiviral em células epiteliais, o que contribui para a eliminação viral¹³. Outros tipos celulares, como linfócitos T e células *Natural Killer* (NK), contribuem ativamente para a eliminação de células infectadas, mas também com a produção de citocinas como IFN- γ e envolvimento indireto na produção de IL-12A, junto a células mieloides¹⁴. As citocinas do tipo interferon não apenas induzem o estado antiviral em diversos tipos celulares, mas estão envolvidas na maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos, produção de óxido nítrico e espécies reativas de

oxigênio, e indução da produção de IL-12A, TNF α e IL-1 β ¹⁵. Já os efeitos gerais da IL-12A incluem o recrutamento e ativação de células NK, a indução da liberação de citocinas – em especial por linfócitos –, o envolvimento na polarização do tipo “T_H1”, a amplificação das respostas de células CD8⁺, a indução da produção de IgG, e o controle de infecções virais¹⁴. Entretanto, muito embora as respostas antivirais ocorram de forma relativamente semelhante em diversos tecidos diferentes, alguns órgãos apresentam características marcantes em seus mecanismos de defesa contra patógenos, como é o caso dos pulmões.

1.2.1 Imunidade Pulmonar

A imunidade nos pulmões representa um grande exemplo onde o equilíbrio entre a ação de células imunes e outras células é essencial para a defesa e manutenção do órgão. Alguns dos componentes de defesa são as próprias células estromais, enquanto outros são produtos secretados, como quimiocinas, citocinas, defensinas e moléculas que formam o muco¹³.

As células do epitélio pulmonar são importantes componentes de defesa, inclusive em condições de leucopenia ou imunossupressão¹⁶. Elas possuem a capacidade de reconhecer patógenos e produzir mediadores imunes, entre eles IL-1 β , IL-6, CXCL8 e GM-CSF, além de outros produtos induzidos pela atuação do Fator Nuclear *Kappa*-B (NF- κ B) e dos genes de resposta ao interferon, contribuindo tanto para processos de ativação quanto de regulação da resposta imune^{16,17}. Por outro lado, também são capazes de liberar citocinas associadas ao perfil de resposta imune adquirida “T_H2” quando expostas a alérgenos, além de contribuírem de forma significativa para a regulação da resposta imunológica através de defensinas e mediadores lipídicos¹⁶.

Tratando de células do sistema imunológico, os macrófagos alveolares constituem 95% do total de leucócitos presentes nos alvéolos, representando uma das principais células de vigilância, limpeza e defesa dos pulmões. Eles são responsáveis pela fagocitose de partículas inertes, como silicatos e partículas de carbono-grafite, sem que isso inicie respostas imunes. Por outro lado, quando fagocitam partículas opsonizadas por imunoglobulinas, proteínas do Complemento ou coletinas, seus receptores do tipo *Toll* contribuem para a discriminação de moléculas derivadas de patógenos. A partir daí macrófagos alveolares contribuem para o início do recrutamento celular ao liberarem CXCL8 e quimiocinas associadas, o que contribui para a quimiotaxia de células como neutrófilos e linfócitos. Além disso, auxiliam na ativação de células da imunidade adquirida ao processar e apresentar

antígenos para células T especializadas em órgãos linfoides periféricos, contribuindo grandemente para os processos de inflamação e, conseqüentemente, seus desfechos¹⁷.

Os processos patológicos pulmonares também são fortemente influenciados por mediadores imunes produzidos por células¹⁷. Por exemplo, a presença dos fatores IL-1RN, IL-6, TNF α , CCL2, CCL4, CXCL8 e CXCL10 nos tecidos pulmonares se correlaciona com a gravidade da infecção por H1N1¹⁸. Por outro lado, a própria variabilidade populacional também é capaz de influenciar a resposta imune local e sistêmica, como observado em ensaios onde o sangue fresco de diversos indivíduos saudáveis foi exposto ao lipopolissacarídeo (LPS) durante seis horas. A dosagem de citocinas posterior revelou concentrações consistentemente elevadas ou baixas de IL-1 β , IL-6, CXCL8, IL-10 e TNF α em diferentes indivíduos¹⁷.

Sendo assim, tanto no contexto das infecções virais respiratórias, quanto no contexto dos diferentes tipos tumorais, é importante considerar a grande variabilidade de respostas imunes, oriundas de fatores controláveis e não controláveis durante os estudos clínicos e/ou translacionais. Essas influências tornam-se ainda mais destacadas em contextos de doenças emergentes, causadas por patógenos novos ou recém-identificados, cujo conhecimento é, geralmente, escasso.

1.3 CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19)

Em dezembro de 2019 a doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19) teve sua etiologia associada ao patógeno designado *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)*, identificado após a incidência de casos de uma pneumonia desconhecida. O agente etiológico foi posteriormente reconhecido como um betacoronavírus relacionado ao *Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV)* e ao *Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus (MERS-CoV)*, associados às epidemias de síndrome respiratória de 2002 e 2012, respectivamente¹⁹. Muito embora apresentasse taxas de hospitalização e mortalidade mais baixas em comparação com *SARS-CoV* e *MERS-CoV*, modelos do início da pandemia indicavam que a taxa de transmissão do *SARS-CoV-2* era consideravelmente maior em comparação aos outros dois vírus, o que ressaltou sua importância epidemiológica²⁰.

Pacientes infectados pelo *SARS-CoV-2* geralmente apresentam febre, tosse seca, dor torácica, falta de ar, infiltrados imunes nos pulmões, e, em alguns casos, falência respiratória, dependendo da gravidade da COVID-19¹⁹. Os sintomas da doença são parcialmente

explicados pelo tropismo tecidual do vírus e seu ciclo de replicação, sendo a infecção das células mediada tanto por proteases quanto pela enzima conversora de angiotensina 2, presente no epitélio respiratório dos brônquios e pulmões¹⁹.

Ainda no início da pandemia de COVID-19, especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) definiram uma escala de progressão da doença. Essa escala leva em consideração a detecção de material genético do *SARS-CoV-2*, a presença ou ausência de sintomas respiratórios, a necessidade de internação hospitalar, e a necessidade de oxigenoterapia em diversos graus – desde a ofertada por máscara de oxigênio até a ventilação mecânica –, além do desfecho óbito²¹.

Assim, cerca de 80% dos casos de COVID-19 são classificados como leves, 15% como graves, e 5% como críticos, apesar de essa classificação variar de região para região¹⁹. No Brasil, dados de Maio de 2020 mostraram que aproximadamente 90% dos casos registrados resultaram em hospitalização, dos quais 30% foram admitidos em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs)²². Apesar da subnotificação de casos leves e assintomáticos, informações posteriores adquiridas no banco de dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) indicaram que 99% dos casos reportados resultaram em hospitalização, dos quais 36% requereram internação em UTI, o que culminou numa taxa de morte de aproximadamente 37%²³. Em Outubro de 2022, o número de casos confirmados no Brasil superou a marca de 34 milhões, enquanto o número de mortos se aproximava de 688 mil, alcançando uma taxa de letalidade de 2%²⁴. No presente trabalho, os dados dizem respeito a coletas realizadas entre Maio e Dezembro de 2020, considerada a primeira onda de casos de COVID-19 no Brasil, onde as variantes de maior prevalência eram a B.1.1.28 e B.1.1.33 (denominadas Gama), associadas a aproximadamente 30% a 65% dos casos reportados²³.

De modo geral, observou-se que indivíduos do sexo masculino com mais de 60 anos, doenças cardiovasculares ou respiratórias crônicas, hipertensão, obesidade ou diabetes apresentavam maior risco de desenvolver a forma grave da COVID-19 e de evoluir para o óbito^{19,25}. Além disso, evidências apontaram que a resposta imune teria forte influência no desfecho da COVID-19.

Usualmente as respostas imunes derivadas de linfócitos T são didaticamente segregadas entre três tipos principais, designadas T_H1 (ou resposta do tipo I), T_H2 (ou resposta do tipo II), e T_H17 (ou resposta do tipo III). O estabelecimento de todas elas é dependente da atuação de células apresentadoras de antígeno e possivelmente células da imunidade inata, do grau de estimulação do receptor de células T a partir do reconhecimento do antígeno, e, em especial, de citocinas^{26,27}. De acordo com a literatura, respostas T_H1 e T_H2 são antagônicas

uma em relação à outra, enquanto as respostas T_H17 podem apresentar elementos das duas respostas anteriores, dependendo do caso²⁷. As respostas do tipo I são iniciadas especialmente pela atuação das citocinas IL-12A e IL-18, mas também de IFN- α e IFN- β , e culminam na expressão de fatores de transcrição como T-bet e NK- κ B e citocinas como IFN- γ e IL-12A²⁶. Respostas do tipo II são originadas principalmente pela atuação da IL-4 e/ou ausência de IL-12A, mas também são influenciadas por IL-6, IL-10 e IL-11, e culminam na expressão de fatores de transcrição como GATA3, PPAR γ , IRF4, STAT6 e BATF, assim como citocinas tais quais IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13^{26,27}. Já as respostas do tipo III são caracterizadas pela liberação de IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22 e TNF α , além da expressão do fator de transcrição ROR γ t, sendo iniciadas por processos que envolvem a ação de IL-6, IL-21 e TGF- β ²⁶.

No geral, respostas T_H1 são associadas à atuação contra vírus, protozoários e bactérias intracelulares, além de algumas respostas autoimunes, enquanto respostas T_H2 estão associadas à resposta anti-helmíntica e às doenças alérgicas, como asma, dermatite atópica, rinite alérgica, e alergias alimentares. As respostas T_H17 , por sua vez, são características da ação contra bactérias e fungos extracelulares, mas também de respostas autoimunes e alérgicas. Respostas do tipo II e III são relativamente comuns nos pulmões²⁷.

Além disso, há indícios de que a síndrome respiratória aguda observada na COVID-19 é derivada do efeito da síndrome de liberação de citocinas (também referida como “tempestade de citocinas”) e da falta de regulação da resposta imune. Ainda, há evidências de que ambos os fatores estão associados com a falha de múltiplos órgãos observada durante a doença²⁵. Mediadores imunes e relacionados à inflamação e ativação celular, como CCL2, CCL3, CXCL10, IL-2, IL-6, IL-7, TNF α , Proteína C Reativa (PCR) e dímeros-D são comumente associados à gravidade da COVID-19 entre pacientes da população geral²⁸. Por outro lado, fatores como interferons parecem contribuir para evitar os quadros mais graves de COVID-19^{29,30}. Há indícios de que especialmente o atraso de respostas de IFN- α , ou a deficiência da resposta de IFN- γ , resultam em complicações da COVID-19, sugerindo que respostas estabelecidas em pontos iniciais da infecção por *SARS-CoV-2* são importantes para a manutenção de um quadro de COVID-19 leve²⁹⁻³¹. Ainda assim, é importante levar em consideração o aspecto temporal da produção de citocinas, quais células são predominantemente afetadas, assim como a variação de sua concentração em momentos específicos da doença.

Quanto à ação de linfócitos, dados da literatura indicam que existe a estruturação de respostas de células CD4⁺, CD8⁺, T regulatórias, e de células B robustas durante o curso da

COVID-19, mas que diferentes perfis imunes estão associados a diferentes desfechos da doença²⁹. No geral, casos graves de COVID-19 estão associados à linfopenia, especialmente em populações de células NK, células T regulatórias, e células CD4⁺ de forma geral, presença de marcadores associados à ativação e/ou exaustão celular entre células T, respostas humorais aberrantes (geralmente extrafoliculares), baixa formação de centros germinativos, e presença de células com o perfil TH17, especialmente nos pulmões^{29,30,32-34}. A presença de células mieloides, primordialmente aquelas com perfis “pró-inflamatórios”, assim como neutrófilos, também já foi fortemente associada a quadros graves de COVID-19^{29,35-37}. Já em relação aos marcadores envolvidos com ativação e exaustão celular, moléculas como PD-1, CTLA-4, e TIM-3 foram associadas, tanto em suas formas de membrana quanto em formas solúveis, a quadros graves de COVID-19, apesar de também serem encontrados entre pacientes com formas mais leves da doença^{38,39}. Ligantes para esses *checkpoints* imunológicos também foram reportados em alta expressão entre diversos tipos de células de pacientes com COVID-19 grave³⁹.

Em termos da resposta imune baseada em anticorpos, muitos estudos apontam uma forte correlação entre a gravidade da COVID-19 e a produção de imunoglobulinas específicas contra o *SARS-CoV-2*⁴⁰. Pacientes da população geral que desenvolvem a forma grave da COVID-19 produzem concentrações mais elevadas de anticorpos em comparação com indivíduos que apresentam apenas a forma leve da doença. Por outro lado, a cinética de produção dos anticorpos também parece influenciar a progressão da enfermidade, visto que a síntese tardia de imunoglobulinas se correlaciona com o óbito⁴⁰. Aparentemente os anticorpos produzidos resultam em proteção relativamente duradoura, com poucos casos de reinfecção grave reportados em indivíduos que passaram por soroconversão⁴⁰. Além disso, pacientes com as formas mais leves da COVID-19 geralmente apresentam respostas extrafoliculares mais rápidas, assim como frequências elevadas de células que sugerem a formação de centros germinativos, e de células B com maior capacidade de produção de anticorpos de alta afinidade⁴¹.

Apesar do número limitado de trabalhos disponíveis, indivíduos com câncer são classificados como uma população com risco elevado de apresentar a forma grave da COVID-19, quando comparados à população geral²⁹. De fato, os dados de sobrevivência à infecção por *SARS-CoV-2* em pacientes oncológicos são muito distintos em relação ao observado entre a população geral^{28,42}. Pacientes oncológicos apresentam maiores chances de hospitalização e morte, com taxas de óbito entre 0,11 a 0,26, variando de acordo com o estudo⁴³. Pesquisas prospectivas conduzidas no fim de janeiro de 2020 apontaram maior risco de internação em

UTIs para pacientes com câncer em relação à população geral. Além disso, indicaram que pacientes que passaram por cirurgia ou receberam quimioterapia ou radioterapia em até um mês antes da infecção apresentaram maior risco de internação em UTI^{20,44}. Esses dados levaram à proposta, entre outras medidas, de que tratamentos quimioterápicos adjuvantes e cirurgias eletivas fossem atrasados, especialmente em regiões com elevado número de casos de COVID-19⁴⁵.

Entretanto, estudos posteriores indicaram que o risco de desenvolvimento da COVID-19 grave em pacientes oncológicos está associado à presença de doenças hematológicas, etnia não-caucasiana, idade superior a 65 anos, linfopenia crônica, tratamentos envolvendo a combinação de corticosteroides e inibidores de *checkpoints* imunológicos, tabagismo atual ou pregresso, hipertensão, e doenças crônicas do coração, pulmões ou rins^{43,46}. No geral, entre pacientes portadores de tumores hematológicos, aqueles que apresentavam leucemia mieloide aguda, linfoma não-Hodgkin agressivo, mieloma múltiplo e doenças relacionadas aos plasmócitos, apresentaram maiores chances de hospitalização e morte⁴³. Especificamente no Brasil, observou-se maior risco de morte entre pacientes com tumores hematológicos, ou com câncer de pulmão⁴⁷.

O impacto das terapias antitumorais no desfecho da COVID-19 é um assunto de interesse que esteve sob intensa investigação. Segundo um levantamento que envolveu a análise de diversos estudos prospectivos e de metanálise, o resultado da COVID-19 é influenciado pelo tipo de tumor, tipo de tratamento antitumoral, e fatores individuais dos pacientes⁴⁷. Por outro lado, alguns estudos apontam que determinados regimes, como as terapias anti-CD20, podem resultar na redução da produção de anticorpos específicos⁴⁷⁻⁴⁹. Portanto, visto que o impacto de terapias antitumorais no desfecho da COVID-19 é complexo e depende de diversos fatores, consideramos aqui que tratamentos que envolvem a depleção de plasmócitos, administrados ao menos um ano antes do diagnóstico da COVID-19, possuem impacto importante durante a infecção causada pelo *SARS-CoV-2*^{50,51}.

Embora muito conhecimento acerca da resposta imune contra a infecção por *SARS-CoV-2* entre pacientes da população geral tenha sido gerado, ressaltando a importância da resposta de perfil “T_H1”, pouco se sabe sobre os perfis imunes em pacientes com câncer⁵². Apesar de alguns estudos revelarem fatores gerais associados ao maior risco de pacientes oncológicos desenvolverem COVID-19 grave e faleceram, e que células B e células T CD8⁺ encontram-se diferencialmente elevadas nesses pacientes oncológicos em comparação com pacientes da população geral, ainda há poucos trabalhos que avaliaram as complexas redes imunológicas na população de pacientes com câncer⁵³⁻⁵⁵. Em particular, o próprio perfil

imunológico e possível imunossupressão de pacientes com tumores ativos podem afetar a resposta imune à infecção por *SARS-CoV-2*, e a subsequente síndrome de liberação de citocinas, de maneiras únicas e ainda desconhecidas^{56,57}.

Sendo assim, nosso estudo teve como objetivo investigar redes imunorreguladoras sistêmicas em pacientes oncológicos com COVID-19, visto que diferentes tipos de tumores influenciam a história natural e o desfecho da doença^{42,58,59}. Imaginamos que, devido à influência do sistema imunológico frente às infecções virais, o desfecho da COVID-19 seria afetado por respostas imunes com características distintas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil imune de pacientes oncológicos com diferentes apresentações clínicas da COVID-19, a fim de detectar características imunológicas associadas a diferentes desfechos da doença.

2.1.1 Objetivos Específicos

1. Investigar a resposta imune humoral de pacientes com tumores hematológicos ou tumores sólidos, diagnosticados com COVID-19, a partir da análise do plasma oriundo de sangue periférico, por meio de técnicas de dosagem de mediadores imunes solúveis por plataformas *multiplex*.
2. Investigar a resposta imune celular de pacientes com tumores hematológicos ou tumores sólidos, diagnosticados com COVID-19, a partir da imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica de células mononucleares de sangue periférico obtidas via gradiente de separação por densidade.
3. Associar os achados das respostas humoral e celular entre si, e com os desfechos clínicos observados ao longo do acompanhamento dos pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19, a fim de associar perfis imunes específicos aos desfechos clínicos da COVID-19.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 RECRUTAMENTO E CLASSIFICAÇÃO DE PACIENTES

Recrutou-se um total de 51 pacientes oncológicos com diagnóstico recente de *SARS-CoV-2* em tratamento no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brasil. No presente trabalho foram utilizadas amostras referentes a um total de 42 pacientes, visto a remoção de algumas amostras devido à desistência, ausência de tumores hematológicos, ausência de amostra de tempo zero, e, em um caso, da presença de tumor hematológico e sólido ativos no mesmo indivíduo ao mesmo tempo (**Figura 1**). Em alguns casos, devido à baixa recuperação de células mononucleares de sangue periférico, não foi possível realizar os ensaios de citometria de fluxo (**Figura 1**). O projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente e arquivado sob número 2858/20 (**Anexo 1**). Todos os pacientes foram informados sobre o projeto e consentiram com a participação no estudo antes que qualquer procedimento relativo à pesquisa fosse iniciado. A gravidade da COVID-19 foi determinada com base no proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com pequenas alterações²¹, sendo: “**COVID Leve**”, no caso de pacientes que não tiveram a necessidade de oxigenoterapia e obtiveram alta; “**COVID Grave + Recuperação**”, no caso de pacientes que precisaram de qualquer tipo de oxigenoterapia, mas se recuperaram da doença e obtiveram alta; e “**COVID Grave + Óbito**”, no caso de pacientes que precisaram de qualquer tipo de oxigenoterapia e cujo desfecho da doença foi o óbito. A determinação do desfecho óbito foi realizada com base na consulta dos atestados de óbito. Todos os pacientes que necessitaram de oxigenoterapia receberam tratamento com dexametasona, conforme recomendado pelo estudo do *RECOVERY Collaborative Group*⁶⁰. As coletas ocorreram de maio a dezembro de 2020, período de maior prevalência das variantes B.1.1.28 e B.1.1.33 (denominadas Gama)²³, e anterior à disponibilização de qualquer vacina direcionada contra o *SARS-CoV-2*. Amostras de dois pacientes da coorte de tumores hematológicos que se recuperaram da COVID-19 grave foram removidas das análises para evitar possíveis vieses estatísticos devido ao baixo número de participantes no grupo. As amostras referentes à primeira coleta de sangue após a confirmação do diagnóstico da infecção por *SARS-CoV-2* foram denominadas de “amostras de tempo zero”.

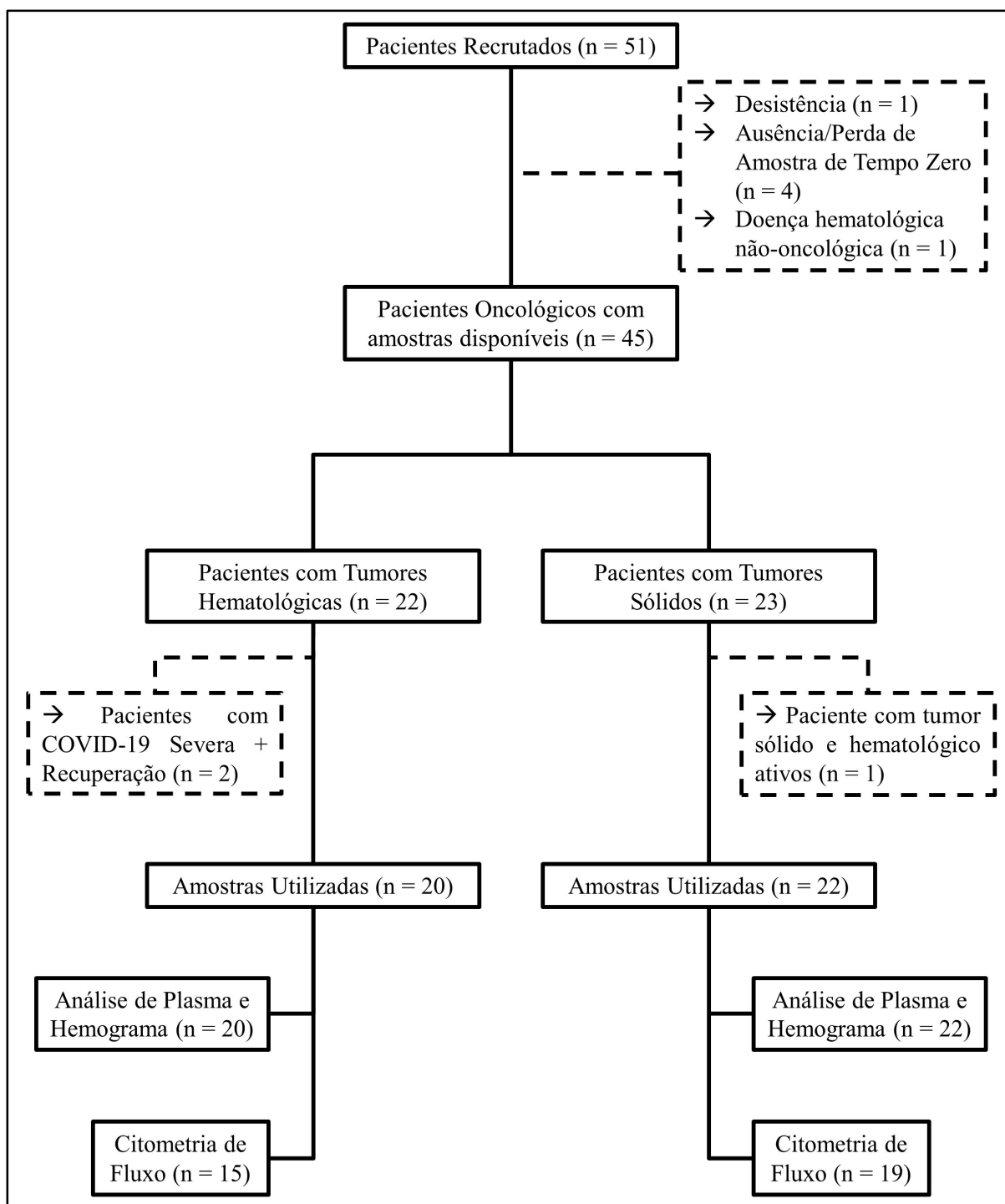


Figura 1 – Fluxograma de recrutamento de pacientes e utilização das amostras do presente estudo. As linhas e caixas tracejadas indicam amostras que foram removidas das análises finais. A queda no número de amostras disponíveis para os ensaios de citometria de fluxo (em relação às análises realizadas no plasma) se deve à baixa recuperação de células mononucleares de sangue periférico em alguns casos.

Fonte: Autoria Própria.

3.2 DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO POR *SARS-CoV-2*

A infecção por *SARS-CoV-2* foi avaliada em qualquer caso em que os pacientes apresentavam sintomas clássicos da COVID-19, como tosse seca, falta de ar, perda de olfato e/ou paladar, e febre. A mesma avaliação foi realizada em outros casos quando indicado pela equipe clínica. Adicionalmente ao quadro clínico, a presença de material genético viral em amostras respiratórias coletadas com *swabs* nasais e de orofaringe foi avaliada por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (*RT-qPCR*).

3.3 AVALIAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIO ELETRÔNICO

Dados relativos à dosagem de fatores bioquímicos (concentração de proteína C reativa e dímeros-D), hematológicos (concentração de leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e plaquetas, hematócrito e concentração de hemoglobina), classificação e estadiamento tumoral, tratamentos antitumorais, e outras informações relevantes foram obtidos nos prontuários eletrônicos disponíveis no banco de dados do A.C.Camargo Cancer Center.

3.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Amostras de sangue foram coletadas com uma mediana de dois dias após o diagnóstico positivo da infecção por *SARS-CoV-2* (intervalo de confiança de 95%: 1 a 4 dias). As amostras foram então processadas para a separação do plasma e de células mononucleares de sangue periférico. O sangue foi centrifugado a 400xg por 10 minutos, a 20°C, para a separação e coleta do plasma, que foi congelado imediatamente em gelo seco e posteriormente armazenado em freezer -80°C até processamento. O sangue remanescente foi diluído em solução tamponada com fosfato (PBS) estéril e centrifugado a 800xg por 20 minutos, a 20°C, em gradiente de separação por densidade (Ficoll-PaqueTM PLUS; GE Healthcare, ref. 17144003). Ao fim da centrifugação as células mononucleares foram coletadas e lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos, a 4°C, à 400xg e ressuspensas em meio de congelamento (*Roswell Park Memorial Institute Medium RPMI-1640* – suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, acrescido de soro fetal bovino – 20% dimetilsulfóxido, na proporção de 1:1). As células foram congeladas lentamente em freezer -80°C com o auxílio de recipiente com álcool isopropílico 100%, durante pelo menos 24 horas e, por fim, armazenadas em nitrogênio líquido até o

processamento. Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram descongeladas apenas uma vez. Dados obtidos na pesquisa de prontuários eletrônicos são oriundos de laudos de amostras de sangue recém-coletado, analisado e liberado pelas equipes de laboratórios de análises clínicas associadas ao hospital. Nesses casos, o laudo utilizado foi o de data mais próxima à coleta de sangue realizada para a pesquisa.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE ANALITOS PRESENTES NO PLASMA

O plasma foi analisado com um ensaio de esferas *multiplex* (*Bio-Plex® Pro Human Cytokine Group 1 Panel 27-plex*, *Bio-Rad Inc.*, EUA) para a quantificação de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. Os mediadores avaliados foram CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CXCL8, CXCL10, CSF2, CSF3, FGF2, PDGFB, VEGFA, IFN- γ , IL-1 β , IL1-RN, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12A, IL-15, IL-17A e TNF α . Os anticorpos das classes IgA, IgG e IgM contra as proteínas *Nucleocapsid*, *Receptor Binding Domain* (RBD), *Spike 1* e *Spike 2* do *SARS-CoV-2* foram detectados com três ensaios de esferas *multiplex* (*Bio-Plex® Pro Human IgA/IgG/IgM SARS-CoV-2 N/RBD/S1/S2 4-Plex Panel*, *Bio-Rad Inc.*, EUA). Antes do início do procedimento, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos, a fim de causar a inativação de possíveis partículas virais, conforme recomendado pelo fabricante dos kits. As demais etapas foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, e as placas foram lidas na plataforma Bio-Plex (*Bio-Plex® 200 system*, *Bio-Rad Inc.*, EUA). Todos os dados de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento estão apresentados em concentração (pg/mL) baseado nas curvas-padrão disponíveis nos kits. No caso dos kits de detecção de anticorpos, os dados estão demonstrados como intensidade de fluorescência.

3.6 ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Amostras de células mononucleares de sangue periférico previamente armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e gradualmente misturadas a 10mL de *RPMI-1640* suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, à temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 400xg, por 10 minutos, a 20°C uma vez, lavadas em PBS estéril numa segunda centrifugação (400xg, por 10 minutos, a 4°C), e ressuspensas em um total de 500 μ L *RPMI-1640* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina-estreptomicina. Após contagem e ajuste de concentração

para $2,5 \times 10^5$ células/mL, anticorpos agonistas para CD3 (BD, ref. 555336) e CD28 (BD, ref. 555725) foram adicionados aos tubos de acordo com as recomendações do fabricante, exceto a um tubo designado como “controle” do ensaio de citometria de fluxo. A estimulação com anti-CD3 e anti-CD28 ocorreu apenas para as células incubadas com o painel “Intracelular” (**Tabela 1**). Posteriormente, todos os tubos foram incubados a 37°C, 5% CO₂ durante a noite e, posteriormente, incubados com brefeldina A, na concentração indicada pelo fabricante, durante mais quatro horas, a 37°C, 5% CO₂. Ao fim da incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS gelado (a 400xg, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensas em 500µL de PBS. Foi adicionado aos tubos o reagente de viabilidade *Fixable Viability Stain* (BD, ref. 565694), na concentração indicada pelo fabricante, durante 30 minutos, sob abrigo da luz. Ao fim da incubação as células foram lavadas (a 400xg, por 10 minutos, a 4°C) em PBS suplementado com 0,2% de Albumina Bovina Sérica (BSA; Sigma, ref. A7979), ressuspensas em 200µL de PBS, e incubadas com *Fc Block* (BD, ref. 564219), na concentração indicada pelo fabricante, durante dez minutos, à temperatura ambiente. Em cada tubo de citometria (exceto o controle negativo), foram adicionados os anticorpos do “Painel Base”. Aos tubos indicados, ainda foi adicionado o painel “Exaustão”, ou o painel “Intracelular”, conforme planejado. Em seguida, os tubos foram incubados durante trinta minutos, a 4°C, sob abrigo da luz. Tubos incubados com o painel “Exaustão” foram lavados uma vez em PBS-0,2% BSA, ressuspensos em 300µL de solução PBS-2% Formaldeído a 37% (Merck; ref. 1.04003.1000), e armazenados a 4°C, sob abrigo da luz, até a leitura em citômetro de fluxo. Já os tubos incubados com o painel “Intracelular” foram lavados uma vez em PBS-0,2% BSA e ressuspensos em 1mL do reagente *Fixation-Permeabilization Solution* (BD, ref. 562574). Após 40 minutos de incubação, a 4°C, sob abrigo da luz, as células foram lavadas uma vez em tampão de lavagem (BD, ref. 562574) e incubadas com o painel “Intracelular” por 40 minutos, a 4°C, sob abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas duas vezes (centrifugações a 400xg, 10 minutos, a 4°C) em tampão de lavagem, ressuspensas em 300µL de PBS-0,2% BSA, e armazenadas a 4°C, sob abrigo da luz, até a leitura em citômetro de fluxo. Todas as amostras utilizadas foram lidas num citômetro *BD FACS Symphony™ A5*, em até 24 horas após o final do experimento, com um intervalo máximo de duas semanas entre si, sem que ocorressem alterações ou manutenções no equipamento. Todos os eventos disponíveis foram adquiridos, considerando um limite de segurança para o equipamento.

Tabela 1 – Lista de anticorpos utilizados para os ensaios de citometria de fluxo.

Painel Base				
Nº de Catálogo (BD)	Alvo	Fluoróforo	Clone	Diluição
566385	<i>Brilliant Buffer</i>	x	x	1:5
624296	CD45	BB790	HI30	1:5000
612964	CD3	BUV661	UCHT1	1:75
566355	CD4	BV750	SK3	1:1000
740963	CD5	BV786	UCHT2	1:500
612889	CD8	BUV805	SK1	1:500
657707	TCR $\gamma\delta$	APC-R700	11F2	1:50
624298	CD45RO	BV570	UCHL1	1:20
566756	CD197 (CCR7)	BV650	2-L1-A	1:30
566398	CD127	BB700	HIL-7R-M21	1:10
612818	CD25	BUV563	2A3	1:260
551138	CD161	PE-Cy5	DX12	1:7
555518	CD56	APC	B159	1:50
612791	CD279 (PD-1)	BUV737	EH12.1	1:150
562395	CD95	PE-CF594	DX2	1:150
554657	<i>Stain Buffer</i>	x	x	1:70
Painel “Exaustão”				
Nº de Catálogo (BD)	Alvo	Fluoróforo	Clone	Diluição
555853	CD152 (CTLA-4)	PE	BNI3	1:4
624297	CD233 (LAG3)	BUV615	T47-530	1:25
565562	CD366 (TIM-3)	BV421	7D3	1:25
742522	CD39	BV605	TU66	1:25
562947	CD19	BV510	SJ25C1	1:25
653314	CD38	APC-H7	HB7	1:8
747720	6B11 (iNKT)	BV711	6B11	1:8
565223	CD183 (CXCR3)	BUV395	1C6/CXCR3	1:8
561659	CD294 (CRTH2)	FITC	BM16	1:16
560620	CD196 (CCR6)	PE-Cy7	11A9	1:25
624295	CD185 (CXCR5)	BB660	RF8B2	1:120
554657	<i>Stain Buffer</i>	x	x	1:10
Painel “Intracelular”				
Nº de Catálogo (BD)	Alvo	Fluoróforo	Clone	Diluição
566385	<i>Brilliant Buffer</i>	x	x	1:4
560047	FoxP3	Alexa 488	259D/C7	1:12
624297	TCF-1	BUV615	S33-966	1:8
12-6502-82 (Thermo)	TOX	PE	TXRX10	1:25
561283	Ki-67	PE-Cy7	B56	1:16
563388	Granzima B	BV510	GB11	1:40
563996	TNF- α	BUV395	MAb11	1:8
562974	IFN- γ	BV605	B27	1:25
562933	IL-17A	BV421	N49-653	1:8
564050	IL-10	BV711	JES3-9D7	1:16
554723	<i>Wash Buffer</i>	x	x	1:17
Estímulos e outros reagentes				
Nº de Catálogo	Alvo	Reagente	Clone	Diluição
555336 (BD)	CD3	Anti-CD3	HIT-3 α	1:40
555725 (BD)	CD28	Anti-CD28	CD28.2	1:40
555029 (BD)	Complexo de Golgi	Brefeldina A	x	1:1000
564220 (BD)	Imunoglobulinas	Fc Block	x	1:4
L23105 (Thermo)	DNA e Esterases	LIVE/DEAD™	x	1:5000

Todos os marcadores do “Painel Base” são utilizados para ambos os painéis “Exaustão” e “Intracelular”.

Fonte: Autoria própria.

3.7 ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DOS DADOS DE CITOMETRIA

Todos os dados adquiridos no citômetro de fluxo foram analisados no programa *BD FlowJo*TM, versão 10.8.0. Matrizes de compensação foram construídas para ambos os painéis “Exaustão” e “Intracelular” utilizando as ferramentas do programa, e ajustadas conforme necessidade para reduzir a interferência que os fluorocromos exercem um sobre o outro (fenômeno conhecido como *fluorescence spillover*). Para as análises não supervisionadas, uma população de interesse (denominada como “*Lymphocytes*”) foi selecionada em cada amostra avaliada (**Figura 2**). Os dados foram, então, reduzidos com a ferramenta “*downsample*” e concatenados com as ferramentas do programa. Apenas amostras com um mínimo de 1500 eventos foram consideradas. Após a seleção dessa população de interesse, foram utilizadas estratégias para a detecção de populações específicas – como células T, B e NK –, de forma semelhante ao observado nas análises manuais (destacadas em seguida).

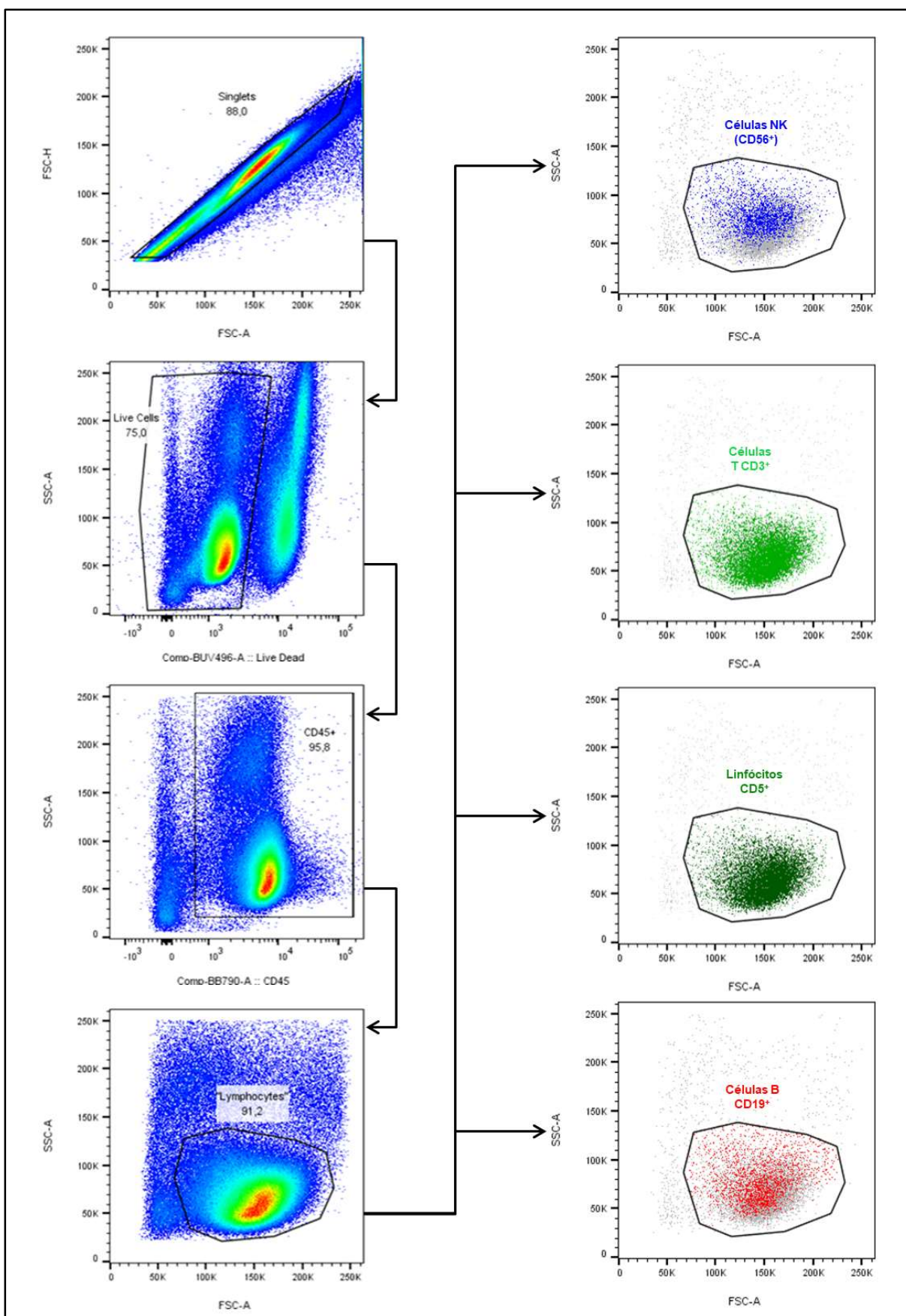


Figura 2 – Estratégia de análise utilizada para a seleção de eventos destinados às análises não-supervisionadas. Os gráficos representam as estratégias de análise utilizadas na seleção de eventos para análises

não-supervisionadas, considerando ambos os painéis “Exaustão” e “Intracelular”. A seleção iniciou nos eventos singulares, seguido pela seleção de células vivas, Leucócitos (CD45⁺), e então para um grupo de eventos localizados na região sudeste em um gráfico de “Tamanho” *versus* “Granulosidade” (geralmente identificados como linfócitos, e denominados aqui de “*Lymphocytes*”). Combinações de marcadores específicos para distinguir células NK (CD56 e CD3, em azul), células T (CD3 e CD56, em verde claro), Linfócitos (CD5 e CD19, em verde escuro), e Células B (CD19 e CD38, em vermelho), foram utilizados para assegurar que os eventos selecionados correspondiam às populações de linfócitos de interesse. Depois dos dados de citometria de todos os pacientes serem analisados com a referida estratégia, os eventos (num mínimo de 1500) foram concatenados em um único arquivo. Pacientes que não apresentavam o valor mínimo de eventos foram excluídos de análises posteriores.

Fonte: Autoria própria.

Para as análises manuais, todas as células foram comparadas com controles negativos, representando células que passaram por todos os procedimentos de incubação e lavagens, mas não receberam nenhuma marcação de citometria de fluxo (**Figura 3**).

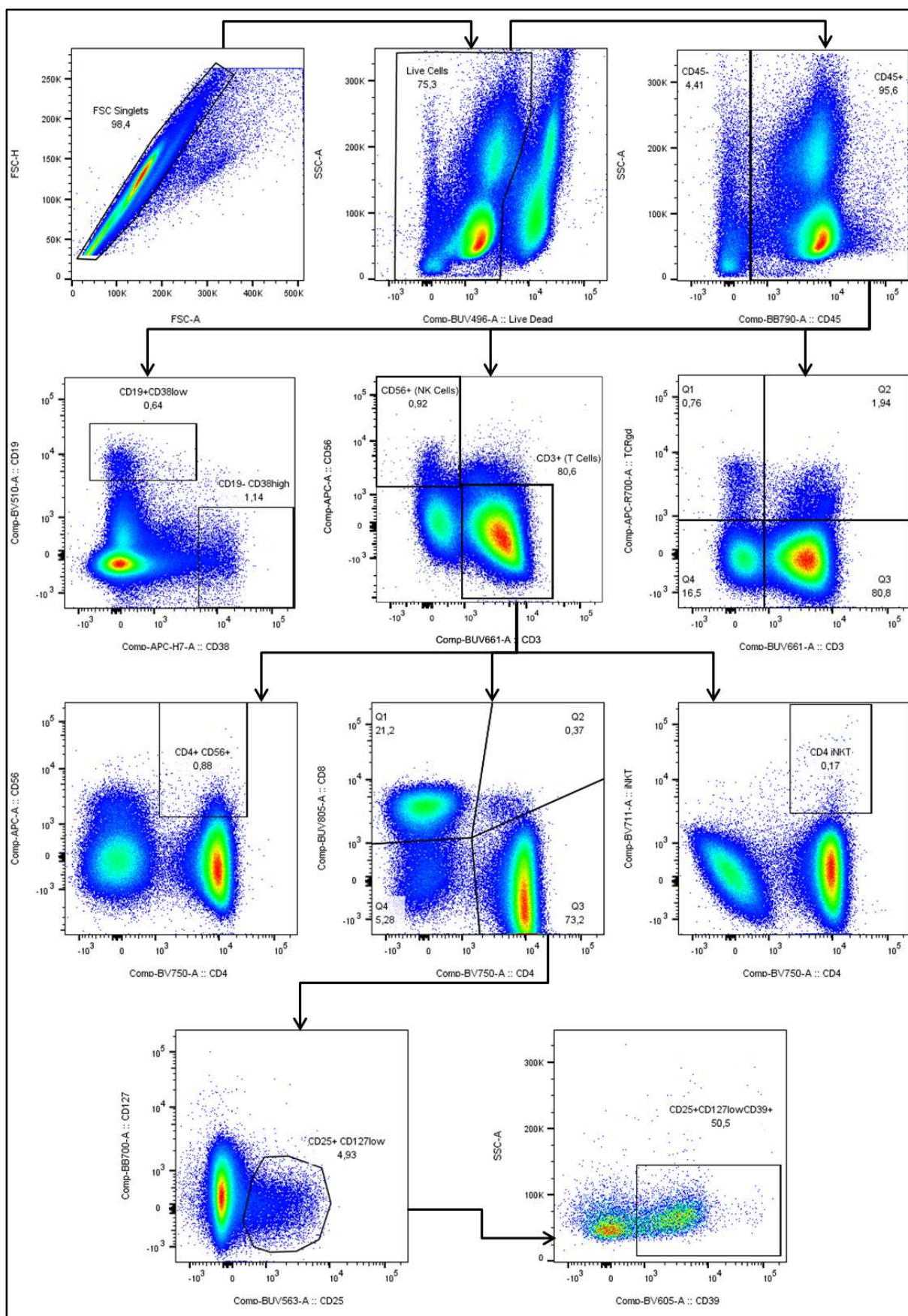


Figura 3 – Estratégia de análise supervisionada para a investigação das principais populações de linfócitos. Os gráficos representam a estratégia de análise supervisionada dos dados de citometria utilizados para

ambos os painéis “Exaustão” e “Intracelular”. A seleção iniciou nos eventos singulares, seguido pela seleção de células vivas, leucócitos (CD45⁺), e então para populações específicas como células T (CD3⁺), células B (CD19⁺CD38⁺), células NK (CD56⁺CD3⁻), células NKT (CD56⁺CD4⁺ ou CD56⁺CD8⁺), células iNKT (CD3⁺6B11⁺CD8⁺ ou CD3⁺6B11⁺CD4⁺), células T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), células T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺CD4⁻), células T duplo-negativas (DN; CD3⁺CD4⁻CD8⁻), células T duplo-positivas (DP; CD3⁺CD4⁺CD8⁺), Células T TCRγδ⁺ (CD3⁺ TCRγδ⁺) e células T regulatórias (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} ou CD5⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺). No caso do painel “Intracelular”, o marcador CD5 foi utilizado para determinar populações de linfócitos T, ao invés do marcador CD3.

Fonte: Autoria própria.

Além da definição das principais populações celulares, ainda foram realizadas análises com marcadores secundários, que auxiliam na determinação de populações com características específicas, como aquelas com indícios de ativação, memória imunológica e exaustão (**Figura 4**).

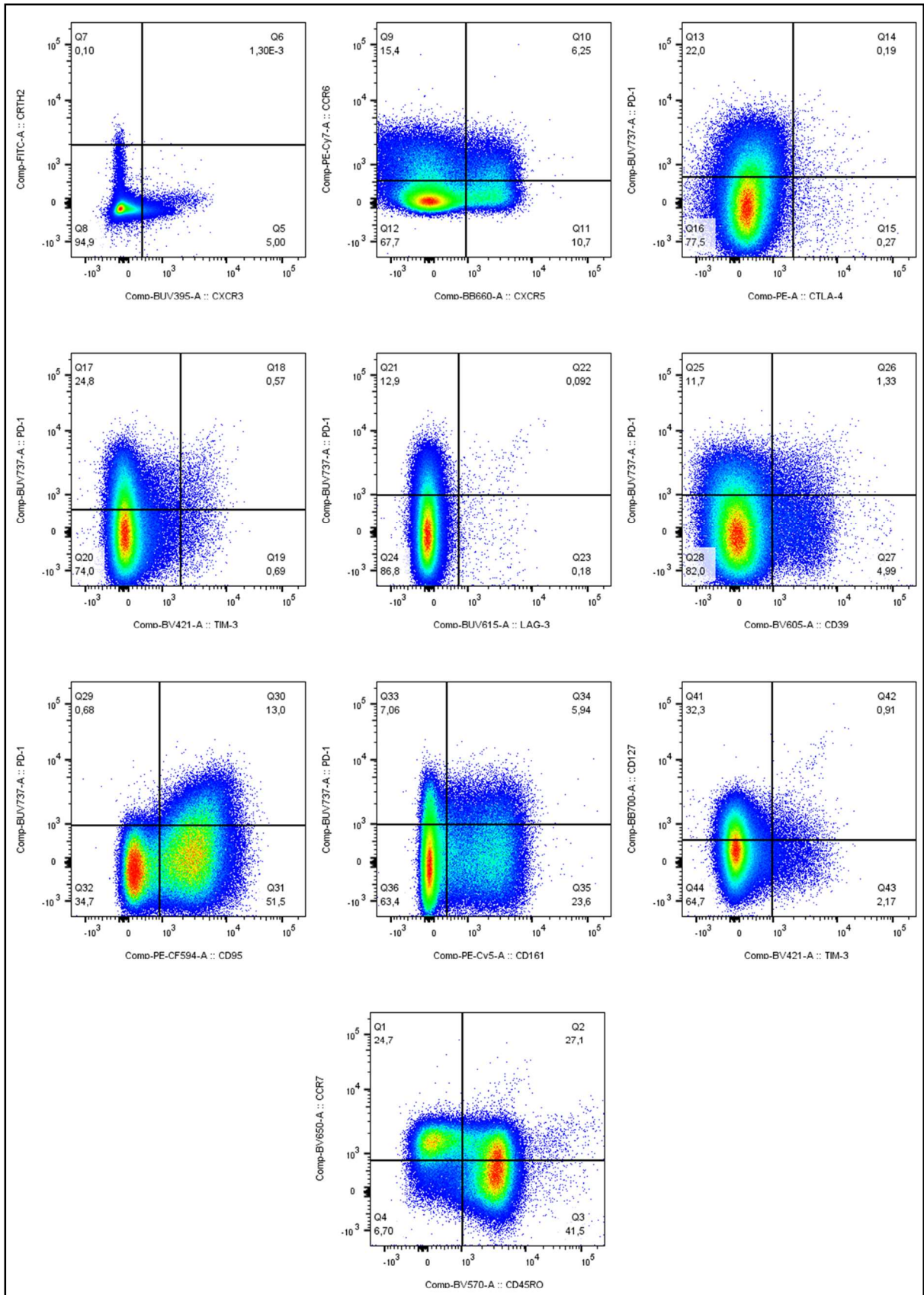


Figura 4 – Estratégia de análise supervisionada para a investigação de subpopulações específicas de linfócitos. Todas as populações específicas de linfócitos [células T, células B, células NK, células NKT, células iNKT, células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T duplo-positivas (CD4⁺CD8⁺), células T TCRγδ⁺, e células T

Regulatórias (T_{reg})] ainda foram caracterizadas por diferentes combinações dos marcadores CCR6, CCR7, CD39, CD45RO, CD95, CD127, CD161, CRTH2, CTLA-4, CXCR3, CXCR5, LAG-3, PD-1, e TIM-3. Apenas algumas combinações estão representadas. Combinações semelhantes foram realizadas para o painel “Intracelular”.

Fonte: Autoria própria.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os diagramas e desenhos foram feitos no programa *Microsoft PowerPoint® 2013*. Os gráficos de pizza, gráficos de barras circulares, e gráficos de radar foram feitos no programa *Microsoft Excel® 2013* ou *Graph Pad Prism* versão 8.4.2.

Para a análise de dados epidemiológicos, como sexo e idade dos pacientes, os grupos foram divididos em categorias (“Feminino” e “Masculino” ou “Jovens” e “Idosos”), e relacionados com o desfecho da doença (“Recuperação”, para aqueles que tiveram doença leve, ou doença grave e se recuperaram; ou “Óbito”, para os pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito). Indivíduos foram considerados “Idosos” caso sua idade fosse igual ou superior a 60 anos. As combinações de categorias foram analisadas com base no teste exato de Fisher, com auxílio do programa *Graph Pad Prism* versão 8.4.2.

Todos os dados oriundos de exames para avaliação de fatores hematológicos e analitos solúveis foram analisados no programa *Graph Pad Prism* versão 8.4.2 para a construção das *Receiver Operating Characteristic curves* (chamadas aqui de curvas ROC), gráficos do tipo dispersão, e gráficos de linha. No caso dos gráficos do tipo dispersão, os dados foram apresentados em mediana, associada ao seu intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos foram analisados para normalidade com base nos testes de D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Visto que os dados, no geral, apresentaram distribuição não paramétrica, amostras de pacientes com tumores hematológicos foram analisadas com o teste de Mann-Whitney, enquanto as de pacientes com tumores sólidos foram analisadas com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste ajustado de Dunn. As curvas ROC foram construídas usando o modelo de regressão logística a partir da fórmula: $\text{Logit}[P(Y=1)] = \text{Ln}[(P(Y=1)/P(Y=0))] = \beta_0 + \beta_1 * B$. Os gráficos de linha relacionados demonstram como os analitos influenciam a probabilidade de morte do indivíduo, a partir dos resultados do modelo supracitado. Uma curva-modelo foi desenhada a partir do Modelo de Crescimento de Gompertz, dado pelo próprio programa, a partir da fórmula: $Y = Y_M * (Y_0/Y_M)^{(\exp(-K * X))}$, onde Y representa a população, Y_0 é a população inicial, Y_M é a população máxima, K determina a fase *lag*, e $1/K$ é o ponto de inflexão de X.

Para os gráficos de radar, dados brutos de intensidade de fluorescência dos ensaios de detecção de anticorpos, incluindo os valores dos controles positivos, foram transformados por $\text{Ln}(\text{X}+1)*10$. Posteriormente, cada medida de cada paciente foi dividida pelo valor do controle positivo da classe de anticorpo referente. Desta forma, valores de intensidade de fluorescência de anticorpos de classes diferentes poderiam ser normalizados, e os dados ficariam dentro de uma escala que varia de 1 a 10.

As análises de agrupamentos não supervisionados e os mapas de calor foram construídos com a plataforma online *ClustVis*⁶¹. Dados brutos de todos os parâmetros com *p*-valor menor que 0,05 foram transformados com a fórmula $[\text{Ln}(\text{X}+1)]$ para análise posterior. As análises foram feitas com um algoritmo de agrupamento hierárquico onde as colunas e as linhas foram agregadas com base na distância de Manhattan ou Canberra e na ligação do tipo Ward. Os elementos faltantes (menos de 2% do total de dados) foram estimados por imputação, como padrão da plataforma.

Gráficos de PCA (*Principal Component Analysis*) foram construídos nos softwares *R*, versão 4.0.0, e *R Studio*, versão 1.4.1106, com os pacotes *factoextra* e *Factoshiny*. Resumidamente, todos os fatores que demonstraram diferenças com um *p*-valor inferior a 0,05 entre as populações avaliadas foram transformados por $\text{Ln}(\text{X}+1)$ e organizados em um *data frame*. Posteriormente, uma análise de componentes principais foi realizada, de forma a demonstrar a distribuição dos pacientes de acordo com a gravidade da doença, assim como os principais fatores com maior contribuição para explicar as variabilidades observadas nas dimensões um (Dim1) e dois (Dim2).

As matrizes de correlação foram construídas com auxílio do programa *Graph Pad Prism* versão 8.4.2. Resumidamente, dados brutos de cada paciente em cada grupo das diferentes coortes foram analisados com o teste de correlação de Spearman. Todos os valores dos coeficientes de correlação foram representados na matriz, mas as correlações com *p*-valor 0,05 ou superior foram sombreadas.

A construção das redes de interação foi feita com auxílio do programa *Cytoscape*, versão 3.8.2. Dados das matrizes de correlação obtidas no programa *GraphPad Prism* foram utilizados para construção das redes, considerando apenas interações com *p*-valor inferior a 0,05. As correlações com valor de *Rho* positivo foram representadas de vermelho, enquanto a cor azul representa correlações com valor de *Rho* negativo. Devido à quantidade excessiva de interações observadas, alguns fatores com características semelhantes foram agrupados e estão devidamente detalhados na legenda das figuras. Nas representações em que aparecem *loops*, a espessura está diretamente relacionada ao número de interações que o grupo de

fatores realiza entre si.

As análises de *Random Forests* foram feitas na plataforma *online MetaboAnalyst*, versão 5.0^{62,63}. Todos os dados brutos foram utilizados, e os valores faltantes (< 2% de todos os elementos) foram estimados por análise Bayesiana de componentes principais. As florestas aleatórias foram construídas com o uso de 500 árvores e sete preditores para determinar os fatores mais importantes para segregar os pacientes com base nos desfechos “recuperação” (que incluiu todos os pacientes que sobreviveram à COVID-19) ou “óbito” (que incluiu todos os pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19).

4. RESULTADOS

4.1 EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DA COORTE

No presente trabalho recrutou-se um total de 51 pacientes que apresentaram diagnóstico de infecção por *SARS-CoV-2* sob tratamento no A.C.Camargo Cancer Center (**Figura 5**).

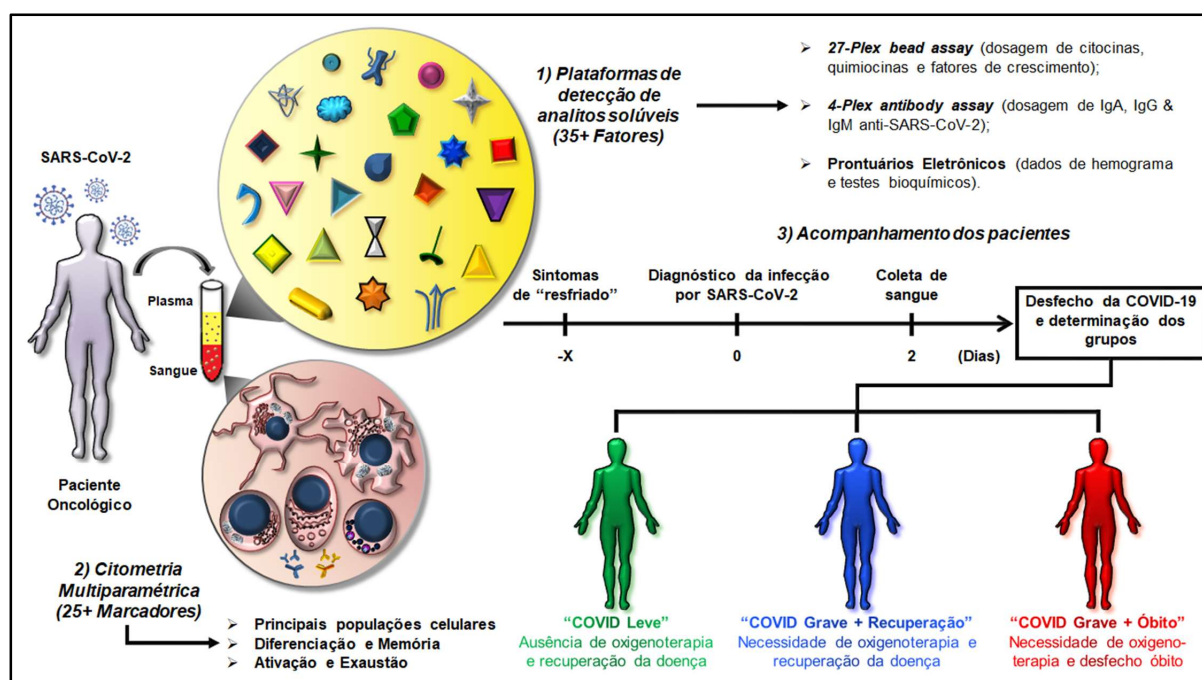


Figura 5 – Desenho experimental utilizado neste projeto. Pacientes oncológicos sob tratamento no A.C.Camargo Cancer Center que apresentaram diagnóstico de infecção por *SARS-CoV-2* foram convidados a participar deste estudo. Após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido, amostras de sangue foram colhidas para avaliações dos perfis imunes humoral e celular. Para determinar a gravidade da COVID-19, cada indivíduo foi acompanhado até o desfecho da doença e avaliado quanto à necessidade de oxigenoterapia.

Fonte: Autoria própria.

Além das coletas de sangue para a determinação dos perfis imunes humoral e celular, os pacientes ainda foram acompanhados ao longo da COVID-19 para determinar a progressão e desfecho da doença, levando em conta a necessidade ou não de oxigenoterapia, com base em recomendações da OMS²¹. Pacientes que não precisaram de oxigenoterapia e receberam alta hospitalar foram classificados com doença leve (grupo "COVID Leve"); Pacientes que receberam qualquer forma de oxigenoterapia e se recuperaram da doença foram classificados com doença grave e recuperação (grupo "COVID Grave + Recuperação"); Pacientes que receberam qualquer forma de oxigenoterapia e vieram a óbito em decorrência da COVID-19 foram classificados com doença grave e óbito (grupo "COVID Grave + Óbito"). Informações detalhadas da coorte estão descritas em seguida (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Características clínicas e demográficas da coorte de pacientes deste trabalho.

		Tumores Hematológicos (n = 20)		Tumores Sólidos (n = 22)		
		COVID Leve (n = 14)	COVID Grave + Óbito (n = 6)	COVID Leve (n = 8)	COVID Grave + Recuperação (n = 9)	COVID Grave + Óbito (n = 5)
Idade	Mediana	58	75	60.5	69	71
	Intervalo	31-86	60-84	32-73	51-78	59-76
	p-valor (mediana)*	$p = 0,1351$		$p = 0,1459$		
	p-valor (Fisher)#	$p = 0,0515$		$p = 0,9999$		
Sexo	Feminino	6 (43%)	2 (33%)	5 (63%)	2 (22%)	3 (60%)
	Masculino	8 (57%)	4 (67%)	3 (37%)	7 (78%)	2 (40%)
	p-valor (Fisher)#	$p = 0,9999$		$p = 0,6241$		
Escore ECOG	Zero	11 (79%)	3 (50%)	6 (75%)	6 (67%)	2 (40%)
	I-II	3 (21%)	2 (33%)	2 (25%)	3 (33%)	2 (40%)
	III-IV	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
	p-valor (Fisher)^S	$p = 0,3000$		$p = 0,2273$		
Tumor Hematológico	Linfoma	9 (64%)	2 (33%)	NA	NA	NA
	Leucemia	2 (14%)	1 (17%)	NA	NA	NA
	Mieloma	2 (14%)	3 (50%)	NA	NA	NA
	Sd. Mielodisplásica	1 (7%)	0 (0%)	NA	NA	NA
Tumores Sólidos	Mama	NA	NA	3 (38%)	0 (0%)	0 (0%)
	Sist. Digestório	NA	NA	2 (25%)	1 (11%)	3 (60%)
	Próstata	NA	NA	2 (25%)	1 (22%)	0 (0%)
	Sist. Urinário	NA	NA	0 (0%)	2 (22%)	2 (40%)
	Pulmões	NA	NA	0 (0%)	2 (22%)	0 (0%)
	Sis. Reprodutivo	NA	NA	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)
	Outro	NA	NA	1 (12%)	2 (22%)	0 (0%)
Comorbidades	Diabetes	3 (21%)	2 (33%)	2 (25%)	2 (22%)	2 (40%)
	Obesidade	1 (7%)	1 (17%)	2 (25%)	2 (22%)	0 (0%)
	Doença Cardíaca	6 (43%)	6 (100%)	4 (50%)	7 (78%)	2 (40%)
	D. Neurológica	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
	D. Pulmonar	1 (7%)	0 (0%)	1 (12%)	3 (33%)	0 (0%)
	D. Renal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (22%)	0 (0%)
	Fumante	1 (7%)	0 (0%)	1 (12%)	1 (11%)	0 (0%)
	Ex-Fumante	2 (14%)	2 (33%)	3 (38%)	2 (22%)	1 (20%)
	Infecção Prévia^{&}	2 (13%)	2 (33%)	0 (0%)	3 (33%)	0 (0%)
Tratamento (Câncer)	Transplante Cel.	2 (14%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Quimioterapia	12 (86%)	5 (83%)	5 (63%)	7 (78%)	4 (80%)
	Anti-CD20[†]	1 (7%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Anti-CD38	1 (7%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Eixo PD-1/PD-L1	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
	Radioterapia	2 (14%)	0 (0%)	2 (25%)	5 (56%)	2 (40%)
	Cirurgia	4 (29%)	0 (0%)	5 (63%)	5 (56%)	4 (80%)
	Terapia-Alvo	0 (0%)	0 (0%)	1 (12%)	2 (22%)	0 (0%)
Situação Tumoral	Em Investigação	5 (36%)	2 (33%)	1 (12%)	0 (0%)	1 (20%)
	Doença Estável	4 (29%)	1 (17%)	4 (50%)	8 (89%)	3 (60%)
	Em Remissão	4 (29%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
	Em Progressão	1 (7%)	2 (33%)	3 (38%)	1 (11%)	0 (0%)

*Considerando pacientes recuperados *versus* falecidos (teste de Mann-Whitney).

[#]Considerando pacientes recuperados *versus* falecidos, a fim de verificar se o desfecho óbito seria influenciado pelo fator “Idade”, considerando a segregação entre “jovens” e “idosos” (teste exato de Fisher).

[§]Considerando pacientes recuperados *versus* falecidos, ao comparar indivíduos com escore *ECOG* 0-2 *versus* 3-4, a fim de verificar se o desfecho óbito seria influenciado pelo fator “Escore *ECOG*” (teste exato de Fisher).

[&]Diz respeito a infecções pulmonares ou infecções crônicas do trato urinário prévias.

[†]Considerando terapias realizadas até um mês antes da confirmação da infecção por *SARS-CoV-2*.

Escore *ECOG* = Diz respeito à escala de performance do *Eastern Cooperative Oncology Group* (*ECOG*).

NA = Não se aplica.

Fonte: Autoria própria.

Dos 51 pacientes recrutados, utilizamos amostras oriundas de 42 indivíduos, dos quais 20 foram diagnosticados com tumores hematológicos, e os 22 restantes apresentavam tumores sólidos (**Figura 6A**). A distribuição por sexo foi de dezoito mulheres e 24 homens. Apenas com propósitos descritivos, também levamos em consideração a idade dos indivíduos, onde pacientes jovens foram definidos como aqueles com 59 anos ou menos e idosos aqueles com 60 anos ou mais. Nos gráficos abaixo, todos os pacientes que se recuperaram (sejam aqueles do grupo COVID Leve ou do grupo COVID Leve + Recuperação) foram designados como “recuperados” (**Figura 6B**).

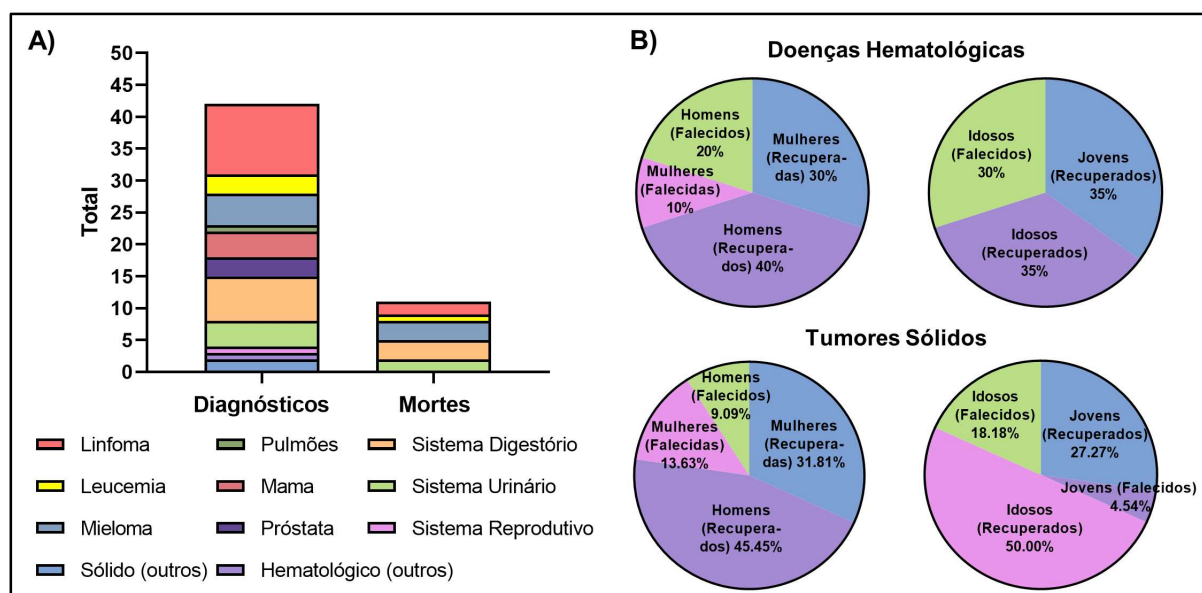


Figura 6 – Caracterização epidemiológica da coorte de pacientes deste estudo. Relação de tipos de tumores e número de mortes durante o período do estudo, obtidos a partir dos prontuários eletrônicos disponíveis no banco de dados do A.C.Camargo Cancer Center, totalizando 20 pacientes diagnosticados com tumores hematológicos, e 22 com tumores sólidos (**A**). Descrição da coorte com base no desfecho da COVID-19 (óbito ou recuperação), sexo (homens e mulheres), e idade dos pacientes – indivíduos foram considerados idosos caso apresentassem idade igual ou superior a 60 anos (**B**).

Fonte: Autoria própria.

Observamos uma ampla distribuição de tumores tanto sólidos quanto hematológicos,

com os casos mais comuns sendo os de linfoma e tumores do trato digestivo. Proporcionalmente, os óbitos foram mais comuns em pacientes com mieloma. Embora possamos fazer essas observações, é importante ressaltar que o número restrito de pacientes e a distribuição heterogênea de tumores não nos permitem sugerir quais indivíduos apresentariam maior risco de óbito de acordo com os tipos tumorais. Também não foram encontradas influências do sexo ou idade dos indivíduos no desfecho da COVID-19, de acordo com o teste exato de Fisher (**Tabela 2**). A exceção foi o caso específico dos pacientes com tumores hematológicos, onde não foram observados óbitos entre pacientes com 59 anos ou menos.

Em seguida, realizamos avaliações mais específicas acerca dos pacientes e suas condições clínicas. Visto que a infecção por *SARS-CoV-2* afeta de forma mais grave pacientes com tumores hematológicos^{43,46}, todas as análises foram feitas de forma segregada. Sendo assim, partimos para a determinação do histórico de infecção de cada paciente, destacando informações como data dos primeiros sintomas, entrada no hospital, pontuação da condição clínica do paciente de acordo com o *Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG) performance status scale*, necessidade de adiamento de terapias antitumorais, oxigenoterapia e data de óbito (**Figura 7**). O dia do resultado do diagnóstico da infecção por *SARS-CoV-2* foi definido como “0”.

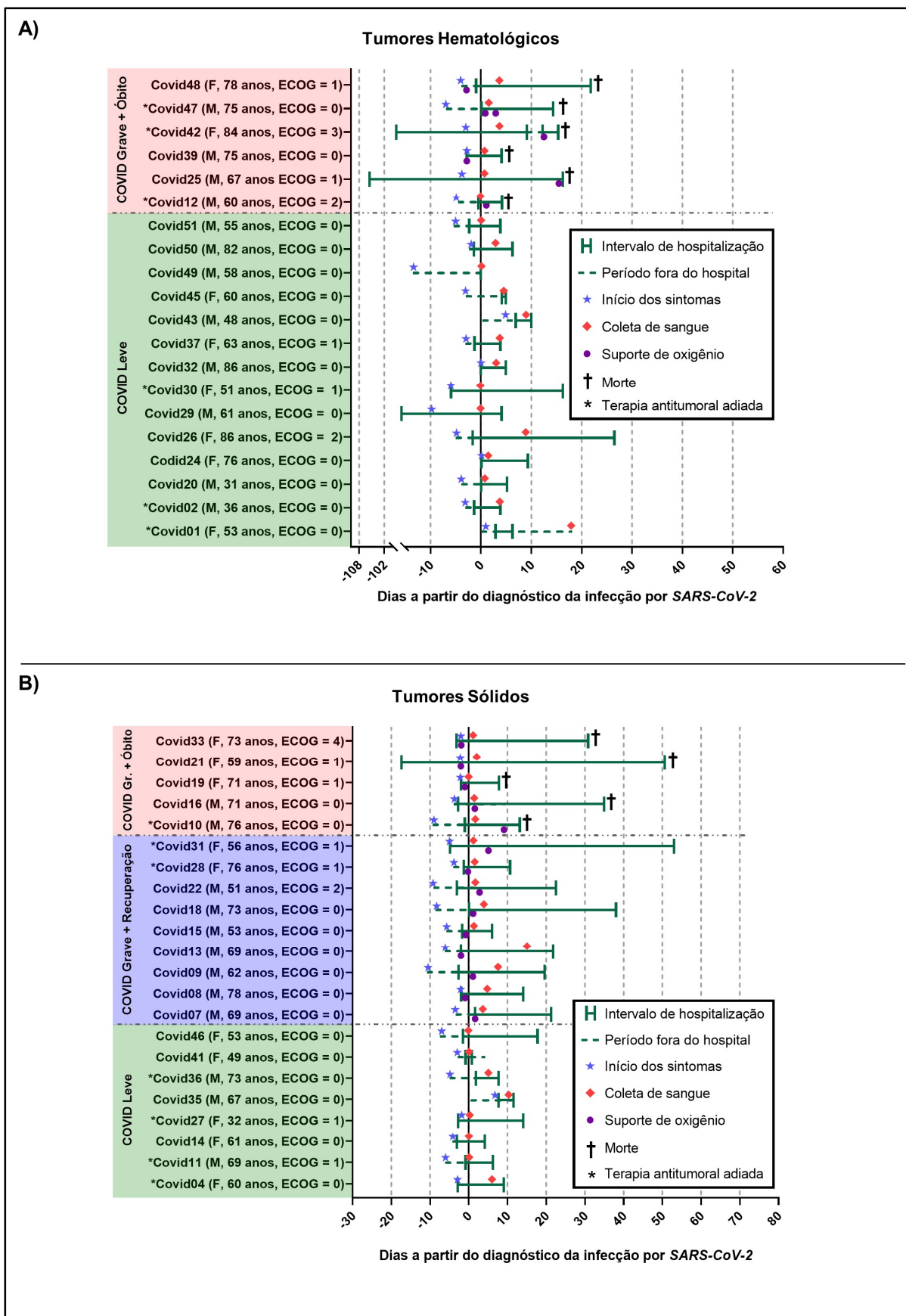


Figura 7 – Detalhes sobre as características clínicas, momento de coleta de sangue e progressão da COVID-19 na coorte de pacientes oncológicos deste estudo. Representação gráfica do histórico hospitalar de cada paciente com tumores hematológicos (A) ou tumores sólidos (B). Estão identificados o tempo de

hospitalização, início dos sintomas, momentos de coleta de sangue, momentos de necessidade de oxigenoterapia, data de óbito, necessidade de atraso da terapia antitumoral, e a pontuação referente à condição clínica do paciente no momento de entrada no hospital, de acordo com o *Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG) performance status scale*. O dia da confirmação do diagnóstico de infecção por *SARS-CoV-2* foi definido como o ponto de referência (tempo zero). F = Feminino; M = Masculino.

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que em ambos os casos os indivíduos apresentaram sintomas dentro de duas semanas antes do resultado do diagnóstico, e que alguns dos pacientes que necessitaram de oxigenoterapia a receberam antes mesmo do diagnóstico da infecção. Também fica destacado que a maior parte das amostras de sangue foi colhida dentro da primeira semana após o diagnóstico da COVID-19. Para ambos os grupos, a mediana entre a data do diagnóstico e a coleta da amostra de sangue foi de dois dias (intervalo de confiança de 95%: 1 a 4 dias). Portanto, os dados apresentados representam o perfil dos pacientes ainda nos primeiros dias após o diagnóstico, antes de sabermos o desfecho da COVID-19.

Sendo assim, iniciamos a investigação de fatores imunes que pudessem indicar o desfecho da COVID-19 entre pacientes oncológicos, ainda nos primeiros dias após a confirmação da infecção por *SARS-CoV-2*.

4.2 DETERMINANTES INDICATIVOS DE ÓBITO ENTRE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Para entender como fatores imunes solúveis influenciam no desfecho da COVID-19 entre pacientes oncológicos, analisamos os dados obtidos em exames de rotina, como resultados de hemogramas e dosagens das concentrações de proteína C reativa e dímeros-D, uma vez que sua presença indica maior risco de óbito entre pacientes da população geral que apresentam a COVID-19 (**Figura 8**)²⁸.

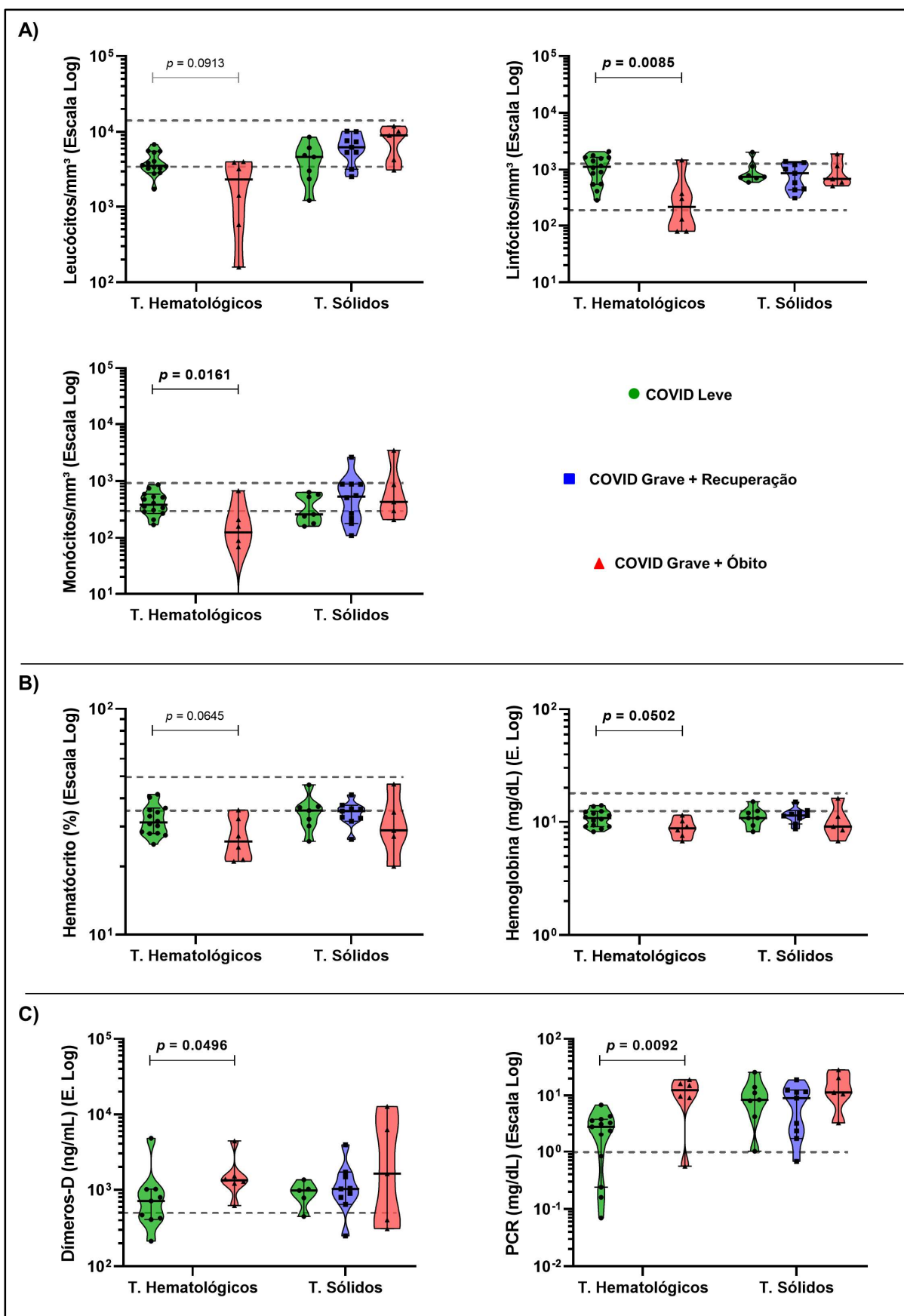


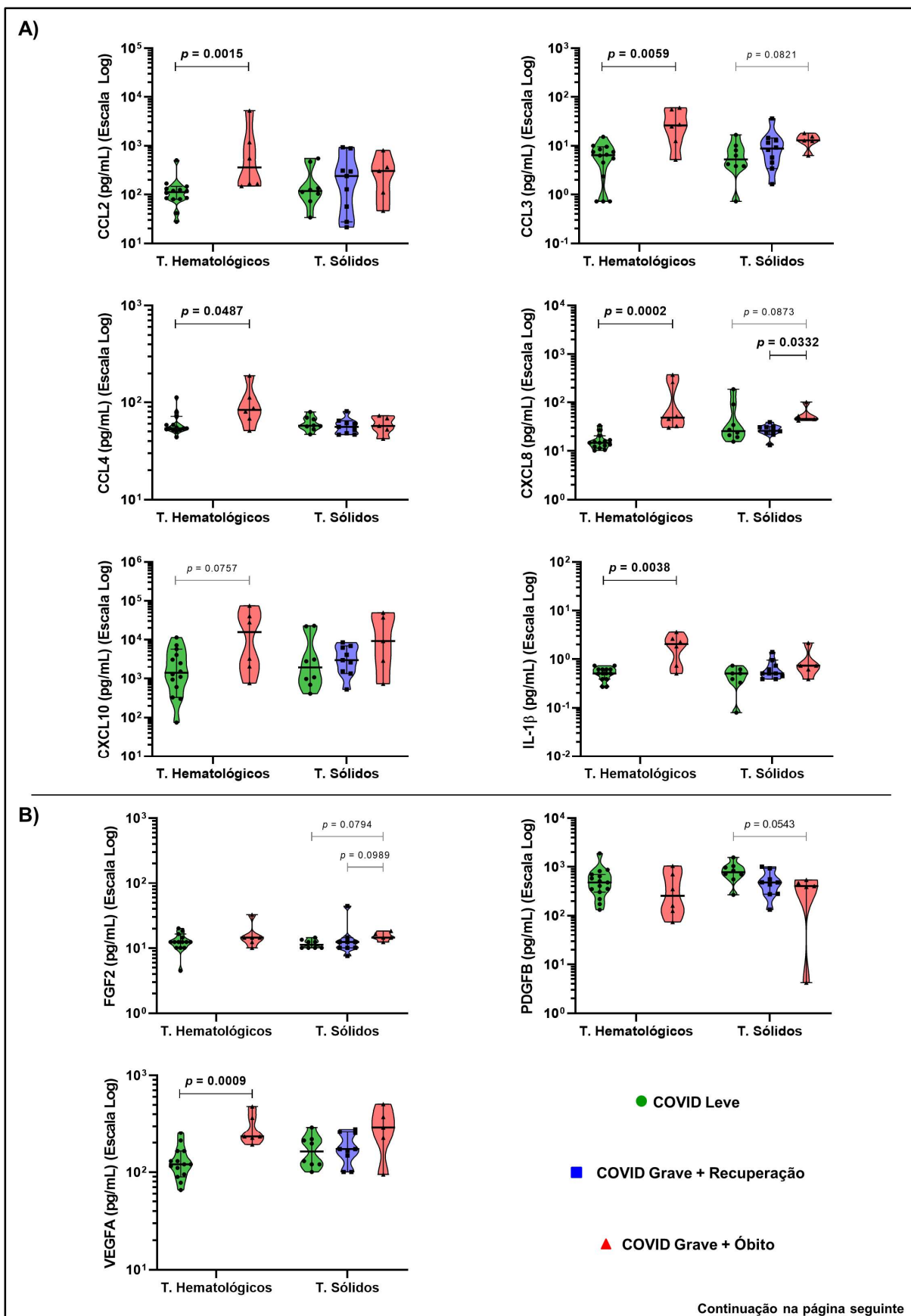
Figura 8 – Análise de fatores bioquímicos e hematológicos indica associação entre baixas contagens de subpopulações de leucócitos e o desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores hematológicos. Dados bioquímicos e hematológicos foram obtidos a partir da avaliação dos exames disponíveis nos prontuários

eletrônicos dos pacientes, considerando a data mais próxima das coletas realizadas pela equipe de enfermeiras de pesquisa. Nos gráficos estão representadas as populações de leucócitos, considerando o número absoluto por mm³ de sangue **(A)**, o hematócrito e a concentração de hemoglobina **(B)**, e a concentração de dímeros-D e proteína C reativa **(C)**. Os valores estão representados como mediana e intervalo de confiança de 95%, em escala logarítmica. Os grupos de pacientes foram definidos a partir do tipo de tumor (sólido ou hematológico) e pela gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados foram analisados com o teste de Mann-Whitney para o grupo de pacientes com tumores hematológicos (**n = 20**) e com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações no caso de pacientes com tumores sólidos (**n = 22**). Linhas tracejadas representam valores de referência presentes nos exames avaliados. *p-valores* inferiores a 0,1 estão representados nos gráficos. PCR = proteína C reativa.

Fonte: Autoria própria.

Pacientes com tumores hematológicos que apresentaram dosagens mais elevadas de proteína C reativa e dímeros-D e valores inferiores de parâmetros hematológicos (como contagem de linfócitos, monócitos, e concentração de hemoglobina) faleceram em decorrência da COVID-19 **(Figura 8)**. Em especial, as contagens de leucócitos foram mais baixas entre pacientes com tumores hematológicos que faleceram do que em pacientes com tumores sólidos que faleceram (resultado não destacado).

Posteriormente, realizamos a dosagem de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no plasma de pacientes oncológicos infectados pelo *SARS-CoV-2* **(Figura 9)**.



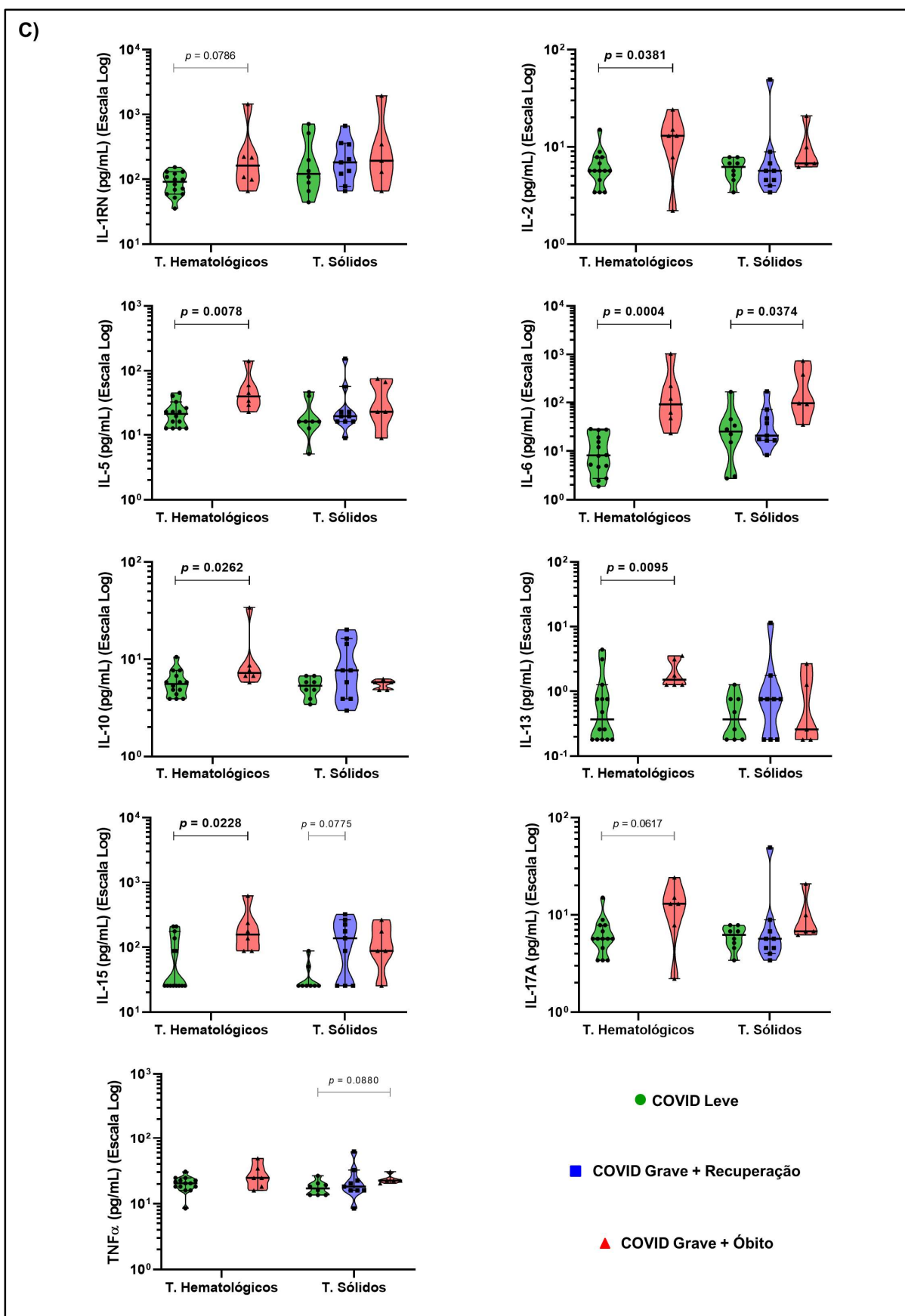


Figura 9 – Pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19 que apresentaram concentrações elevadas de mediadores imunes no plasma tiveram maior chance de óbito. As coletas de sangue foram realizadas, em mediana, dois dias após o diagnóstico da COVID-19, e o plasma foi utilizado para a dosagem de mediadores

imunes solúveis. Os gráficos trazem a representação da concentração de quimiocinas (**A**), fatores de crescimento (**B**), e citocinas (**C**). Os dados estão representados como mediana e intervalo de confiança de 95% da concentração do analito, em escala logarítmica. Os grupos de pacientes foram definidos a partir do tipo de tumor (sólido ou hematológico) e pela gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados foram analisados com o teste de Mann-Whitney para o grupo de pacientes com tumores hematológicos (**n = 20**) e com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações no caso de pacientes com tumores sólidos (**n = 22**). *p*-valores inferiores a 0,1 estão representados nos gráficos. IL1RN = *IL-1 Receptor Antagonist*.

Fonte: Autoria própria.

Entre pacientes com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19, observamos concentrações elevadas de fatores associados com o recrutamento de células imunes, como a citocina IL-1 β , o fator de crescimento VEGFA, e as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CXCL8 (**Figura 8**). Também observamos uma discreta indicação de aumento na concentração de CXCL10 e IL-1RN. Além disso, concentrações elevadas de fatores de inflamação de fase inicial, como as citocinas IL-6 e IL-15 também foram detectadas. As citocinas associadas com fases mais tardias da resposta imune, como IL-2, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A também apresentaram concentrações elevadas entre indivíduos com tumores hematológicos que faleceram (**Figura 8C**).

Já entre pacientes com tumores sólidos, as únicas diferenças com *p*-valores inferiores a 0,05 foram: **i)** o aumento na concentração de IL-6 em pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito, em comparação com pacientes que apresentaram apenas a doença leve; e **ii)** o aumento na concentração de CXCL8 em pacientes cujo desfecho da doença foi o óbito em comparação com aqueles que conseguiram se recuperar da forma grave da COVID-19 (**Figura 9A-B**). Outras discretas alterações foram observadas nas concentrações das citocinas IL-15 e TNF α , e dos fatores de crescimento FGF2 e PDGFB (**Figura 9B-C**).

Curiosamente, fatores associados à COVID-19 grave na população geral, como IL-12A e IFN- γ , não apresentaram concentrações diferentes entre os grupos avaliados neste estudo (**Figura 10**).

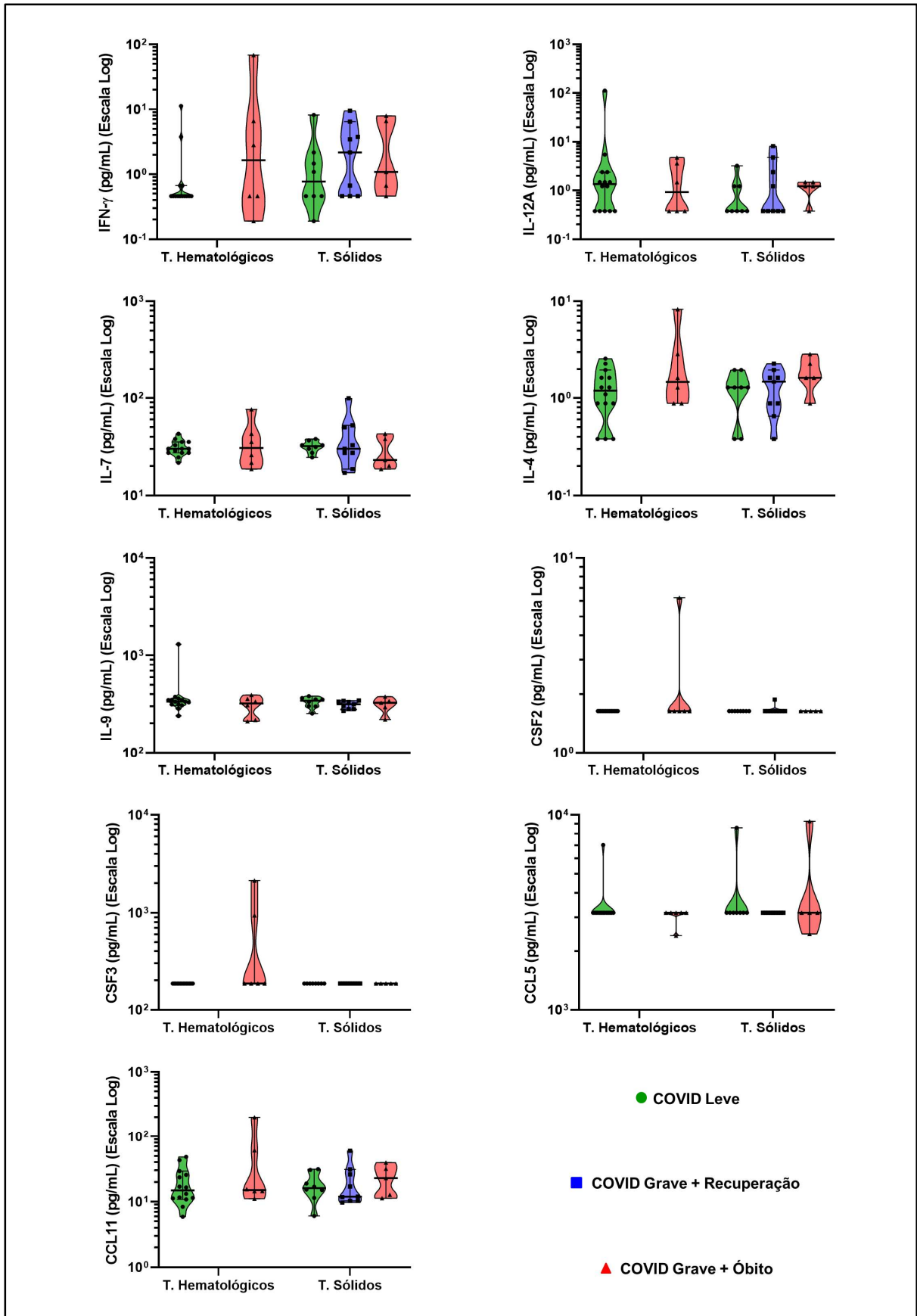


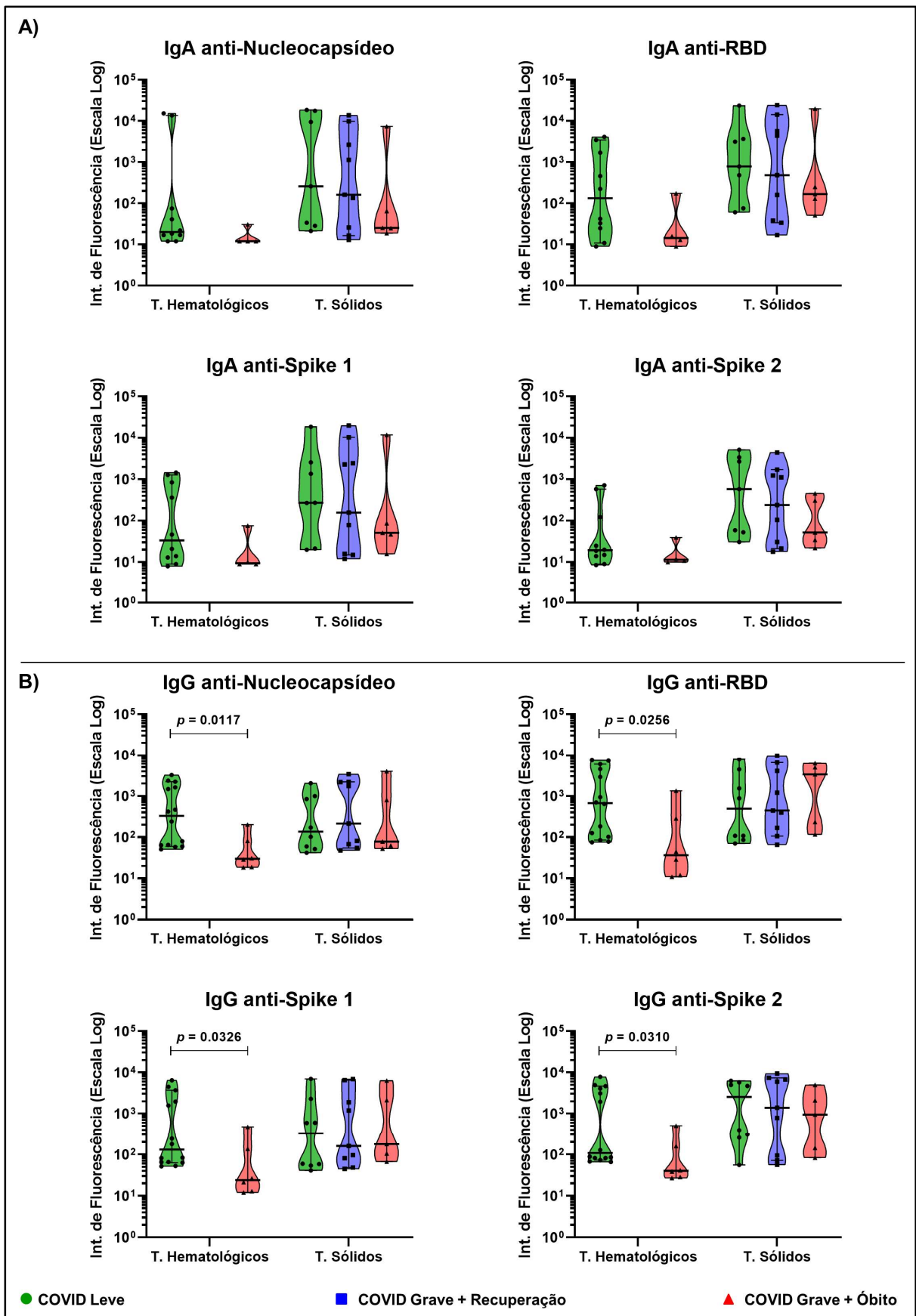
Figura 10 – Pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19 não apresentaram alterações nas dosagens de IFN- γ ou IL-12A, independentemente da gravidade da doença. As amostras de sangue foram coletadas com uma mediana de dois dias após o diagnóstico da COVID-19, e o plasma utilizado para a dosagem

de mediadores solúveis. Os gráficos trazem a representação da concentração de analitos solúveis nos quais os *p*-valores foram iguais ou superiores a 0,1. Os dados estão representados como mediana e intervalo de confiança de 95% da concentração do analito, em escala logarítmica. Os grupos de pacientes foram definidos a partir do tipo de tumor (sólido ou hematológico) e pela gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados foram analisados com o teste de Mann-Whitney para o grupo de pacientes com tumores hematológicos (**n = 20**) e com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações no caso de pacientes com tumores sólidos (**n = 22**).

Fonte: Autoria própria.

Conforme indicado na figura acima, também não foram observadas diferenças nas concentrações de IL-4, IL-7, IL-9, CSF2, CSF3, CCL2 ou CCL11.

Em seguida, visando determinar a influência de imunoglobulinas na COVID-19, utilizamos plataformas *multiplex* para avaliar a produção de anticorpos IgA, IgG e IgM contra proteínas do *SARS-CoV-2*, sendo elas *Nucleocapsid*, *Receptor Binding Domain* (RBD), *Spike 1* e *Spike 2* (**Figura 11**).



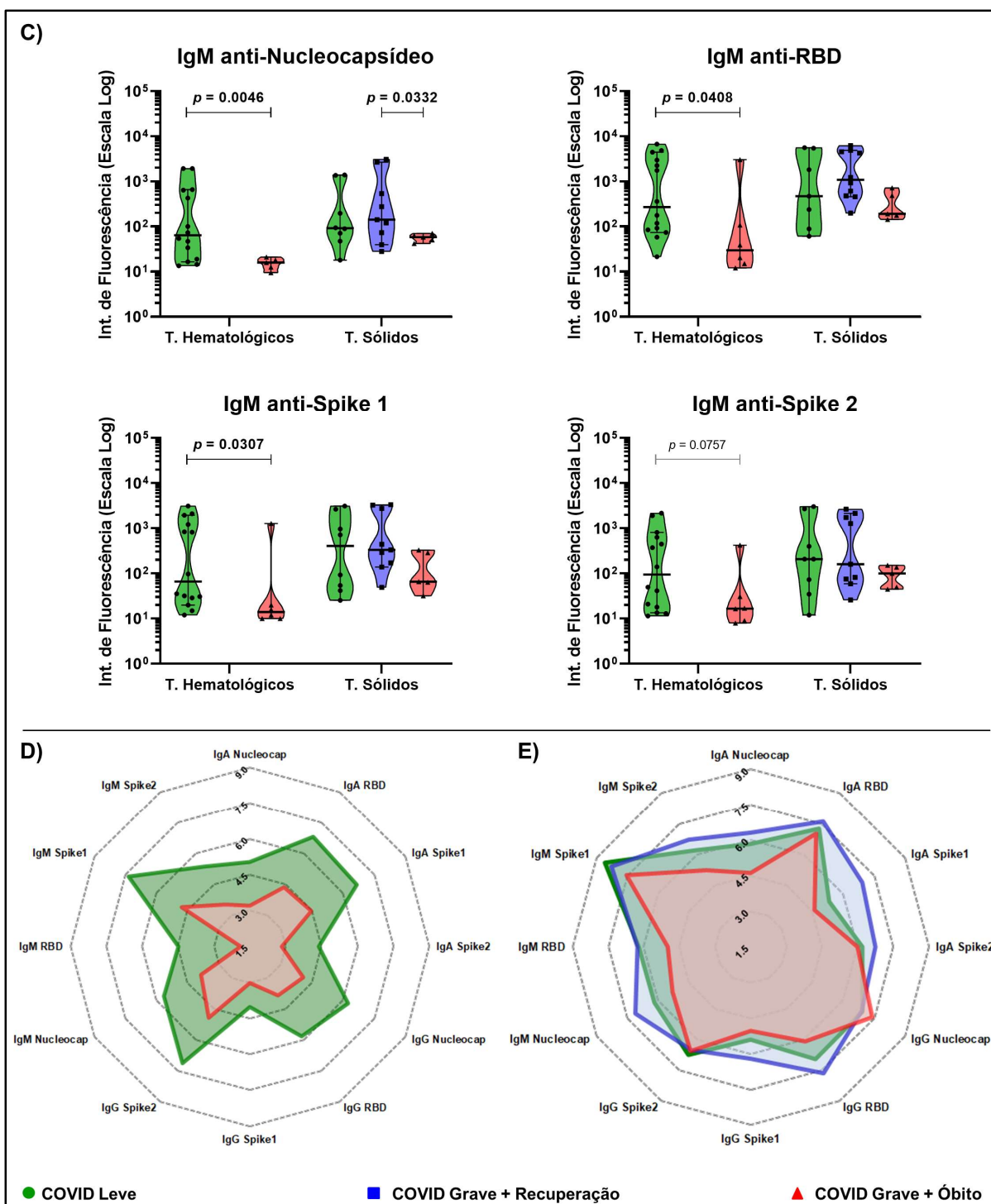


Figura 11 – Pacientes com tumores hematológicos e COVID-19 apresentaram baixa produção de anticorpos contra proteínas do *SARS-CoV-2* antes da progressão da doença. As amostras de sangue foram coletadas com uma mediana de dois dias após o diagnóstico da COVID-19, e o plasma utilizado para a dosagem anticorpos IgA (A), IgG (B) e IgM (C) contra as proteínas virais *Nucleocapsid*, *Receptor Binding Domain*, *Spike 1* e *Spike 2* do *SARS-CoV-2*. Os valores estão representados como mediana e intervalo de confiança de 95% da intensidade de fluorescência, em escala logarítmica. Nos gráficos de radar estão representados os valores médios, transformados por $\text{Ln}(X+1)$, da produção de anticorpos para os pacientes com tumores hematológicos (D) ou tumores sólidos (E). Os grupos de pacientes foram definidos a partir do tipo de tumor (sólido ou hematológico) e pela gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados foram analisados com o teste

de Mann-Whitney para o grupo de pacientes com tumores hematológicos (**n = 20**) e com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações no caso de pacientes com tumores sólidos (**n = 22**). *p-valores* inferiores a 0,1 estão representados nos gráficos.

Fonte: Autoria própria.

De forma geral, pacientes com tumores hematológicos que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19 tiveram maior produção de anticorpos IgG e IgM contra proteínas do *SARS-CoV-2* em relação aos pacientes que faleceram, enquanto não foram observadas diferenças na produção de anticorpos IgA (**Figura 11A-D**). Dentre pacientes com tumores sólidos, observou-se diferença apenas na produção de IgM anti-nucleocapsídeo entre pacientes que faleceram em comparação com aqueles que tiveram a forma grave da doença, mas se recuperaram (**Figura 11C**). Adicionalmente, observou-se que a produção de IgG contra proteínas do vírus é superior em pacientes com tumores sólidos que faleceram em decorrência da COVID-19, em relação ao grupo de pacientes equivalente, mas com tumores hematológicos (dados não destacados).

Em seguida, prosseguimos para a investigação de parâmetros celulares específicos utilizando como base a técnica de citometria de fluxo multiparamétrica. Para tanto, células mononucleares de sangue periférico foram descongeladas e marcadas com diferentes anticorpos. Dois painéis de citometria foram construídos a fim de detalhar populações e subpopulações de linfócitos, além de suas características de ativação, exaustão, memória, e produção de citocinas (**Tabela 3**). Células incubadas com o painel “Intracelular” foram estimuladas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, além de um bloqueador do Complexo de Golgi, em etapa posterior. Visto a variedade de populações celulares diferencialmente expressas (considerando um *p-valor* menor ou igual a 0,05), alguns resultados referentes à coorte de pacientes com tumores hematológicos foram segregados daqueles referentes à coorte de pacientes com tumores sólidos. Destacamos, ainda, que devido à baixa quantidade de células mononucleares de sangue periférico disponíveis em algumas das amostras, o número total de pacientes de ambas as coortes sofreu redução.

Tabela 3 – Dicionário dos marcadores de citometria de fluxo utilizados neste trabalho.

Combinação de Marcadores	Interpretação / Nomenclatura Utilizada
Célula CD19 ⁺ CD38 ^{+/−}	Célula B
Célula PD-1 ⁺ CD161 ⁺	Célula Ativada/Exausta
Célula PD-1 ⁺ IFN- γ ⁺	Célula Ativada/Exausta
Célula PD-1 ⁺ IL-10 ⁺	Célula Ativada/Exausta
Célula PD-1 ⁺ IL-17A ⁺	Célula Ativada/Exausta
Célula PD-1 ⁺ Ki-67 ⁺	Célula Ativada/Exausta
Célula CD19 ⁺ CD38 ^{+/−} CXCR5 ⁺ CCR6 ⁺	Célula B Ativada e Diferenciada
Célula GzB ⁺	Célula com característica de perfil Citotóxico
Célula CD39 ⁺	Célula com característica de perfil Regulatório
Célula IL-10 ⁺	Célula com característica de perfil Regulatório
Célula IFN- γ ⁺	Célula com característica de perfil “T _H 1”
Célula IL-17A ⁺	Célula com característica de perfil “T _H 17”
Célula Ki-67 ⁺	Célula em processo de proliferação
Célula TIM-3 ⁺	Célula Exausta
Célula PD-1 ⁺ CTLA-4 ⁺	Célula Exausta
Célula PD-1 ⁺ TOX ⁺	Célula Terminalmente Exausta
Célula TOX ⁺ TCF-1 [−]	Célula Terminalmente Exausta
Célula TOX ⁺ TCF-1 ⁺	Célula Terminalmente Exausta
Célula CD56 ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 [−]	Célula NK Efetora
Célula CD3 ⁺ CD4 ⁺ CXCR5 ⁺ CCR6 ⁺	Célula T CD4 ⁺ Folicular
Célula CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 ⁺	Célula T de Memória Central
Célula CD3 ⁺ CD4 [−] CD8 [−]	Célula T Duplo-Negativa
Célula CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	Célula T Duplo-Positiva
Célula CD3 ⁺ CD45RO ⁺ CCR7 [−]	Célula T Efetora de Memória
Célula CD3 ⁺ CXCR5 ⁺ CCR6 ⁺	Célula T Folicular
Célula CD3 ⁺ CD45RO [−] CCR7 ⁺	Célula T <i>Naïve</i>
Célula CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 [−]	Célula T Regulatória
Célula CD5 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127FoxP3 ⁺	Célula T Regulatória
Célula CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ CRTH2 ⁺ CXCR3 [−]	Célula “T _H 2” Duplo-Positiva
Célula CD56 ⁺	Célula NK
Célula CD3 ⁺	Célula T
Célula CD5 ⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺	Célula T
Célula CD45 ⁺ CD3 [−] CD56 [−]	Leucócito “Não-T”
Célula CD5 ⁺ CD3 [−]	Linfócito

Fonte: Autoria própria.

Iniciamos a investigação utilizando um algoritmo de análise não-supervisionada de dados, o *Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)*, aplicado na população de linfócitos caracterizada em Material e Métodos (**Figura 2**). O *UMAP* é uma ferramenta capaz de organizar e projetar geograficamente os eventos a partir de seus atributos, agrupando ou segregando eventos com base em suas características.

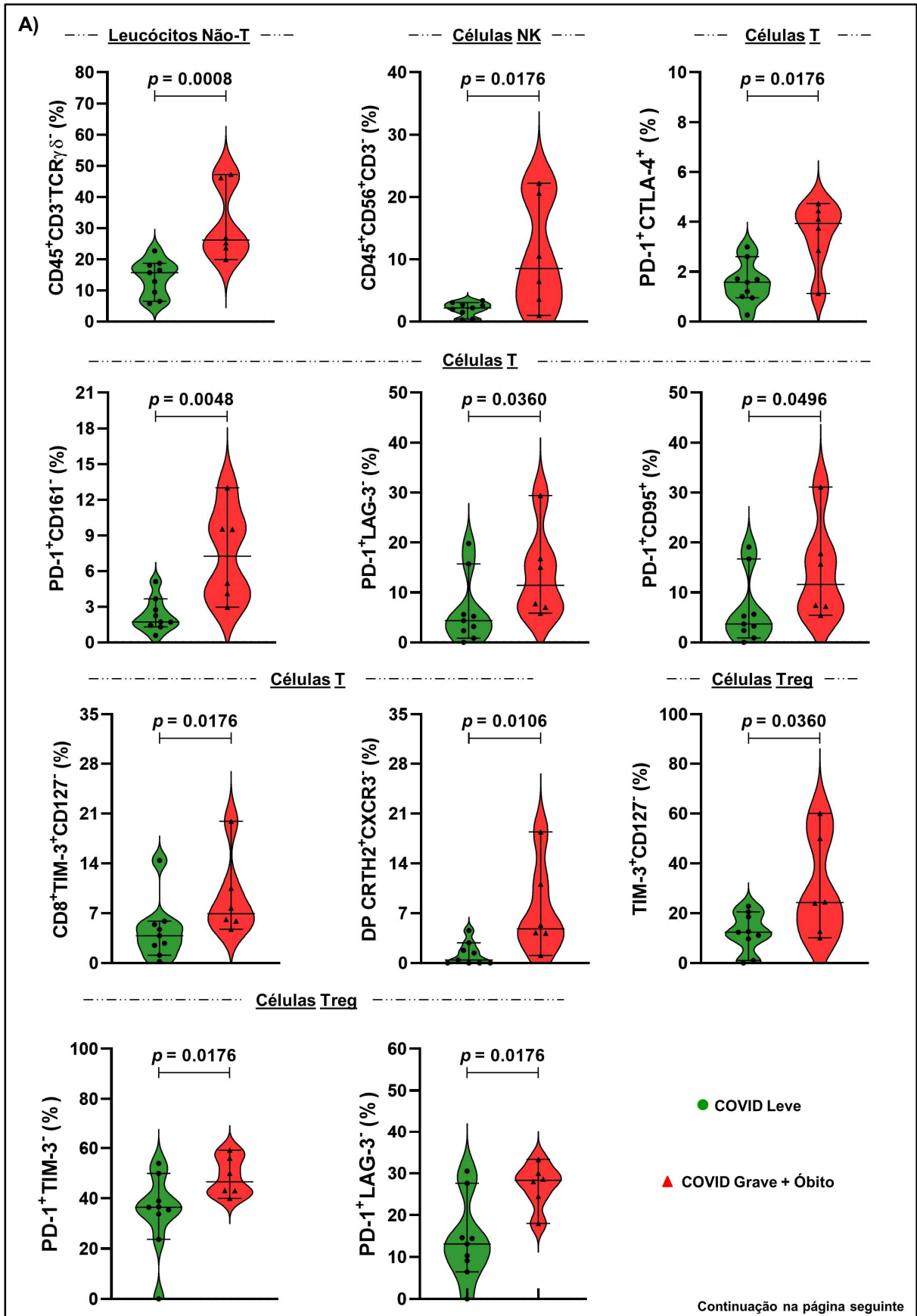
Com esses dados em mãos, utilizamos marcadores clássicos para identificar as principais populações de linfócitos (células T, células B, e células NK), e determinamos suas respectivas frequências (**Figura 12**).

painel “Intracelular”), incubadas com Brefeldina A durante quatro horas, e marcadas com diferentes painéis de anticorpos para citometria, segundo descrito em Material e Métodos. Dados de citometria foram analisados com um algoritmo de análise não *supervisionada* (*Uniform Manifold Approximation and Projection - UMAP*), que agrupa os eventos de acordo com sua similaridade. As estratégias de análise das populações e subpopulações de linfócitos estão descritas em Material e Métodos. Representação da distribuição de células oriundas de pacientes com COVID Leve (Verde) e COVID Grave + Óbito (Vermelho) **(A)**, das frequências das principais subpopulações celulares, incluindo células T CD4⁺, células T CD8⁺, células B e células NK **(B)**. Representação da distribuição de células oriundas de pacientes com tumores sólidos e COVID Leve (Verde), COVID Grave + Recuperação (Azul) e COVID Grave + Óbito (Vermelho), de acordo com os painéis “Exaustão” **(C)** ou “Intracelular” **(E)**. Representação das frequências das principais subpopulações celulares, incluindo células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T Duplo-Negativas (CD4⁻CD8⁻), células T TCRγδ⁺, células NK e células B, de acordo com os painéis “Exaustão” **(D)** “Intracelular” **(F)**. Representação de 25 subpopulações e suas frequências de acordo com os algoritmos *X-Shift* e *Cluster Explorer*, com destaque para populações diferencialmente expressas entre os três grupos de pacientes com tumores sólidos, referentes ao painel “Exaustão” **(G)**. Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados como mediana e seus respectivos intervalos de confiança de 95% e foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações. *p*-valores inferiores a 0,1 estão representados nos gráficos. Coorte de tumores hematológicos: Painel “Exaustão”: **n** = 9 (COVID Leve); **n** = 6 (COVID Grave + Óbito). Coorte de tumores sólidos: Painel “Exaustão”: **n** = 7 (COVID Leve); **n** = 7 (COVID Grave + Recuperação); **n** = 5 (COVID Grave + Óbito). Painel “Intracelular”: **n** = 4 (COVID Leve); **n** = 5 (COVID Grave + Recuperação); **n** = 3 (COVID Grave + Óbito).

A avaliação da frequência das principais populações, com base no painel “Exaustão”, revelou proporções semelhantes de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre pacientes oncológicos de forma geral **(Figura 12A-D)**. Já no painel “Intracelular”, utilizado apenas para as amostras de pacientes com tumores sólidos, verificamos uma proporção mais elevada de células não identificadas, possivelmente revelada pela falta de marcadores específicos para populações de células B **(Figura 12E-F)**. Em seguida, aplicamos os algoritmos *X-Shift* e *Cluster Explorer* sob os dados de ambas as coortes. Em decorrência da ausência de diferenças nas proporções de subpopulações de linfócitos entre pacientes com tumores hematológicos, apenas os dados da coorte de pacientes com tumores sólidos estão representados. Sendo assim, em pacientes com tumores sólidos observamos uma elevação de subpopulações de células B entre indivíduos que vieram a óbito em decorrência da COVID-19, além de uma população de células T CD8⁺ *naïve* entre pacientes que apresentaram apenas a forma leve da doença **(Figura 12G)**.

A partir disso realizamos análises supervisionadas para determinar o perfil imune dos pacientes, com o objetivo de complementar a avaliação das populações encontradas nas

análises não-supervisionadas. Inicialmente, investigamos as populações celulares de pacientes com tumores hematológicos, comparando aqueles que faleceram em decorrência da COVID-19 com os que apresentaram apenas a forma leve da doença (**Figura 13**).



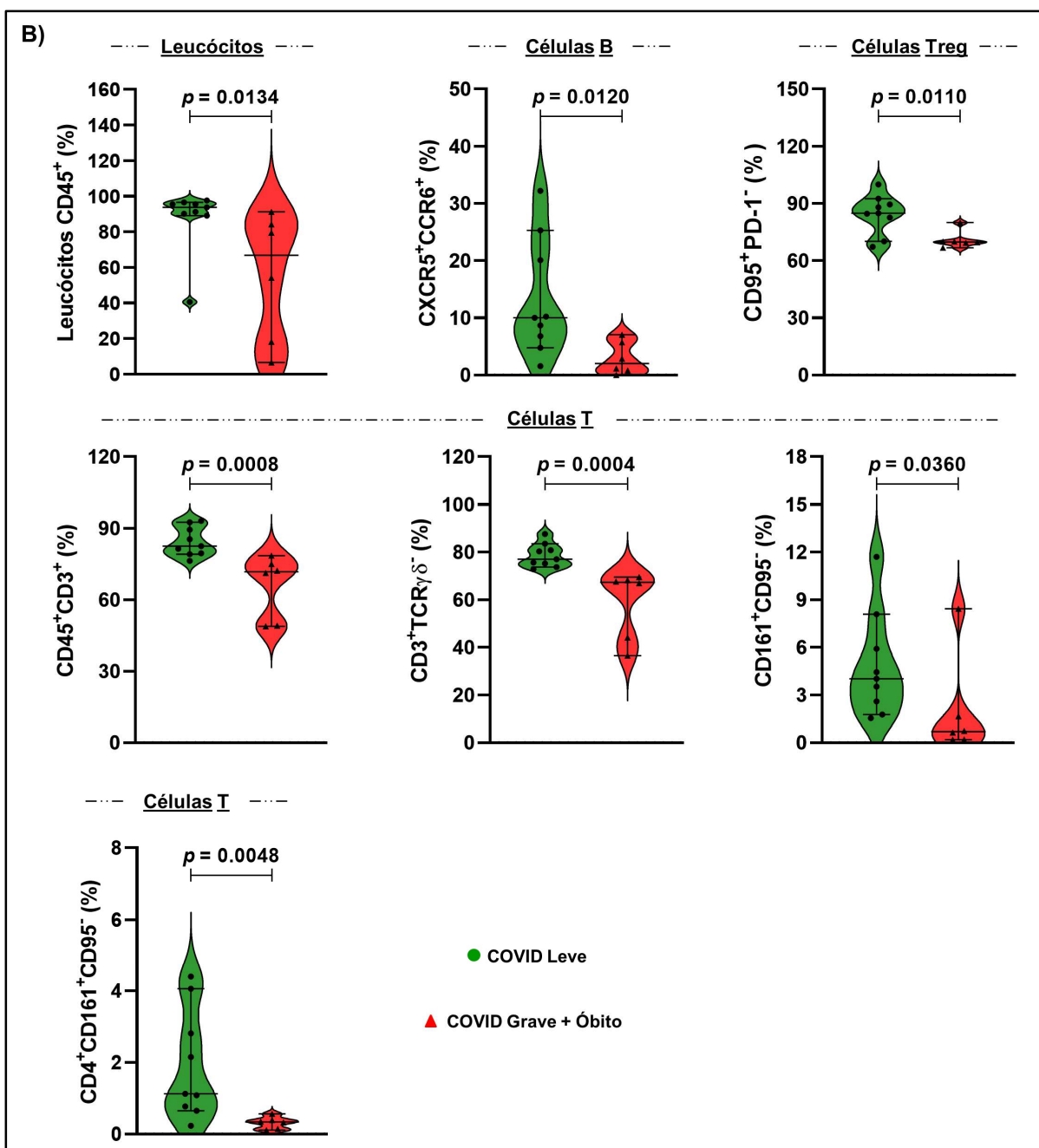
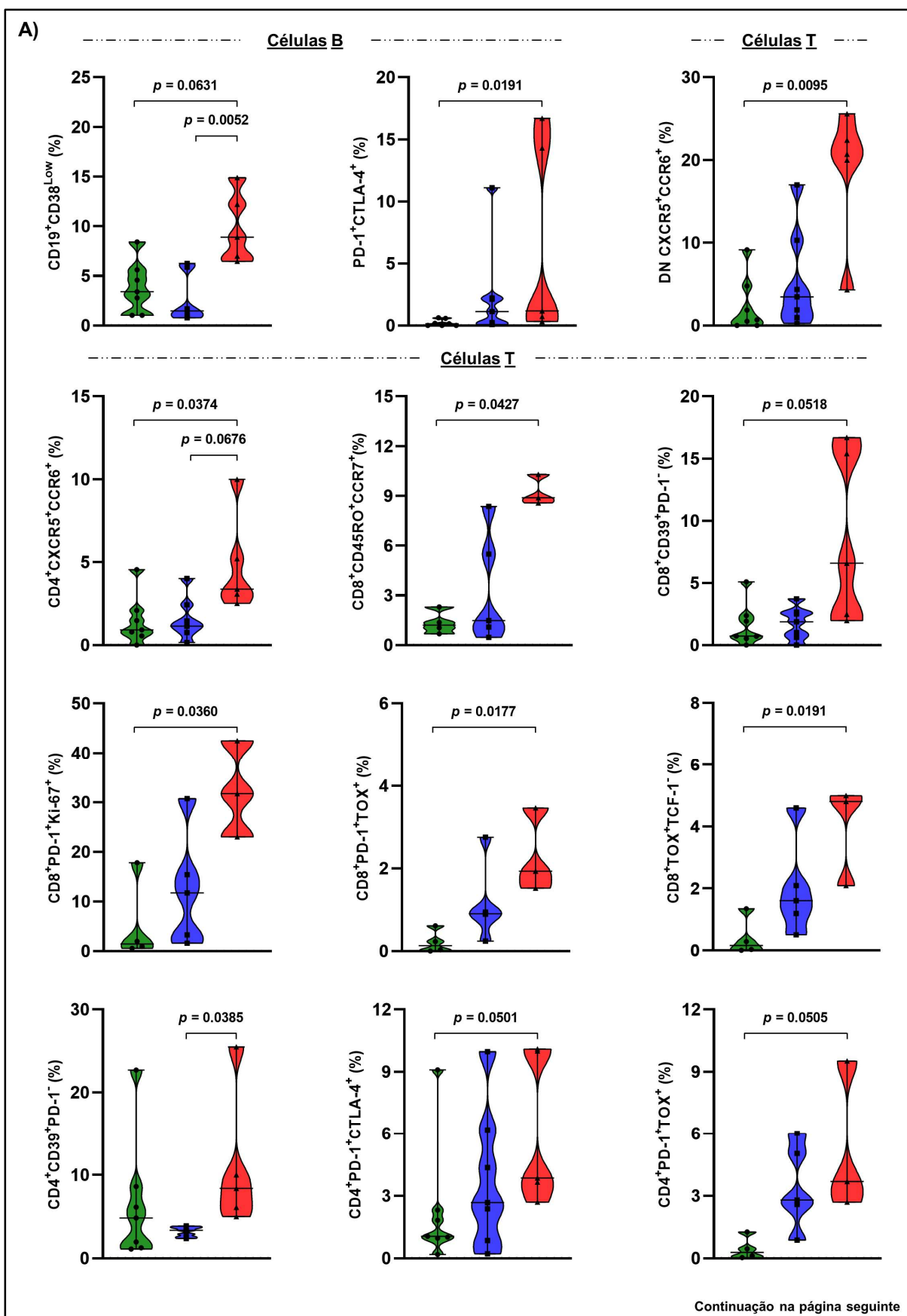


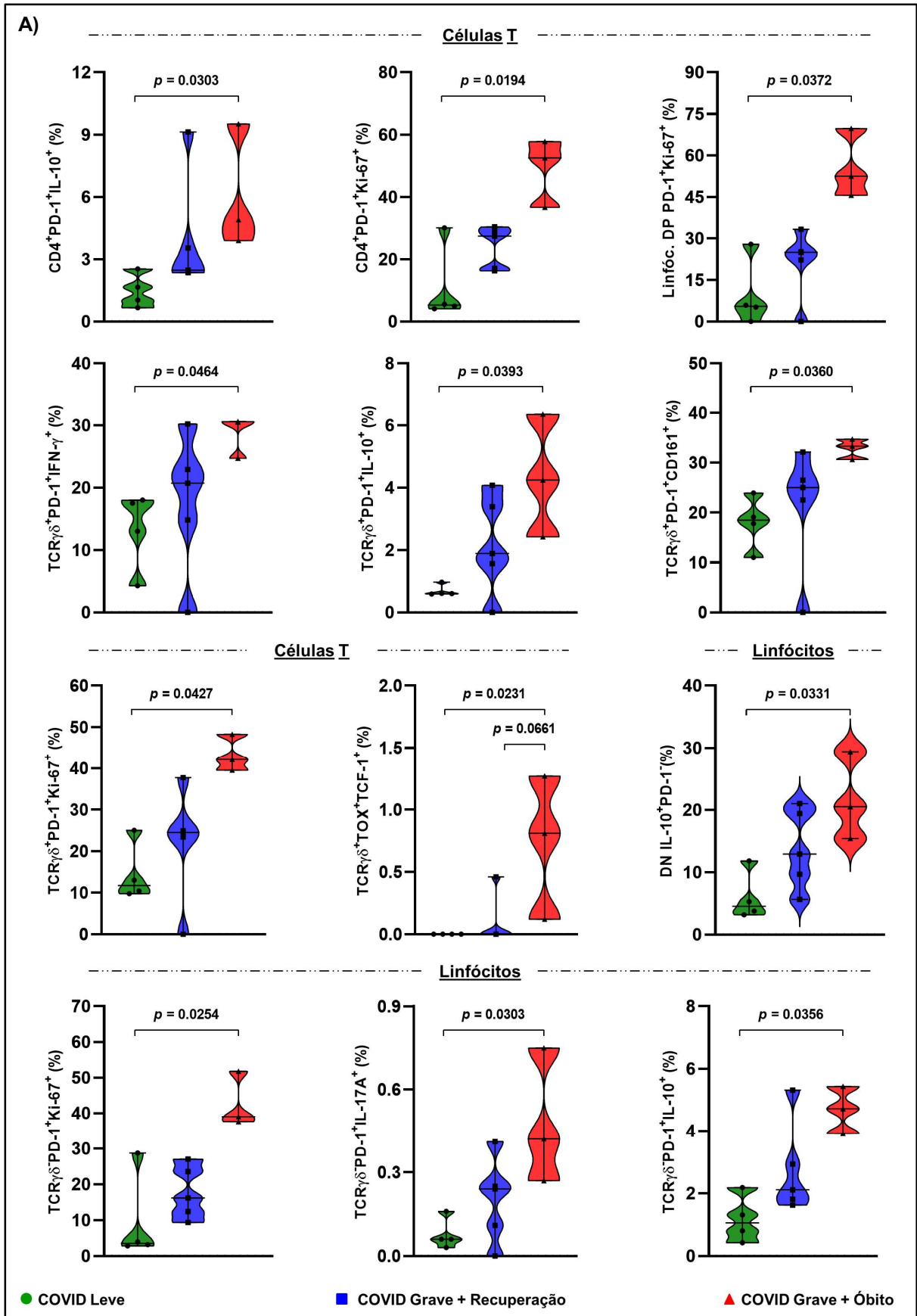
Figura 13 – Análise dos dados de citometria de fluxo revela que pacientes com tumores hematológicos que apresentaram COVID-19 leve possuem frequências elevadas de células B ativadas e diferenciadas. Células mononucleares de sangue periférico foram descongeladas e marcadas com o painel “Exaustão”, segundo descrito em Material e Métodos. As estratégias de análise das populações e subpopulações de linfócitos também estão descritas em Material e Métodos. Os gráficos em violino representam a frequência das populações diferencialmente expressas entre grupos COVID Grave + Óbito (Vermelho; n = 6) (A) e COVID Leve (Verde; n = 9) (B). Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados como mediana e seus respectivos intervalos de confiança de 95% e foram analisados com o teste de Mann-Whitney.

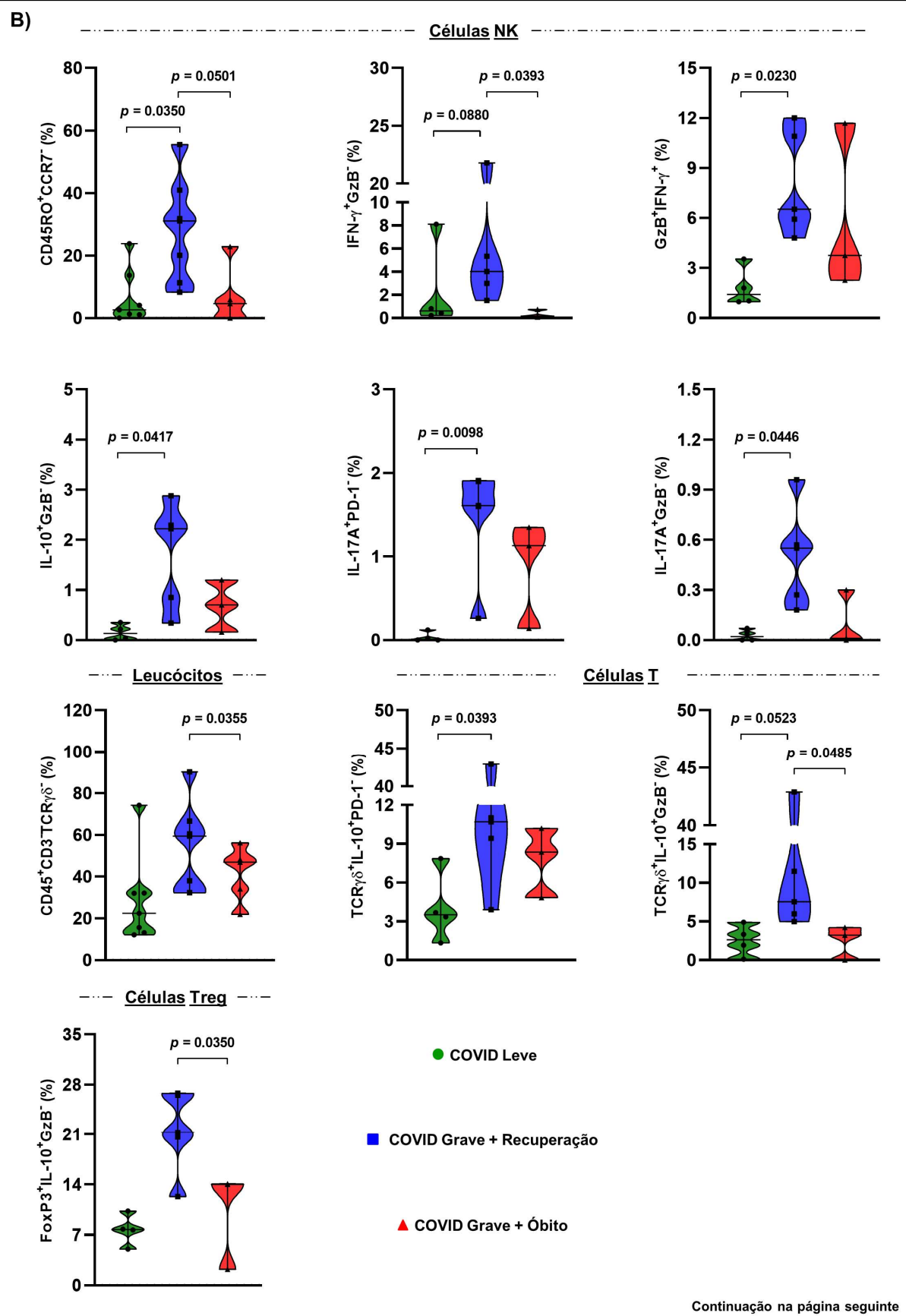
Fonte: Autoria própria.

Entre pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19, observou-se um claro padrão de aumento na presença de “leucócitos não-T”, células NK, e células T duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) que expressam o marcador CRTH2. Além disso, observou-se aumento na frequência de células T expressando marcadores associados à exaustão celular (**Figura 12A**). Pacientes que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19 mostraram outro padrão de células circulantes, com frequências mais elevadas de células T no geral, células T expressando o marcador CD161, e células B expressando os marcadores CXCR5 e CCR6, denominadas aqui como “células B ativadas e diferenciadas”. Curiosamente, esses pacientes também apresentaram uma população de células T regulatórias expressando o marcador CD95 (**Figura 13B**).

Entre pacientes com tumores sólidos, por sua vez, observamos três padrões distintos de células imunes circulantes (**Figura 14**).







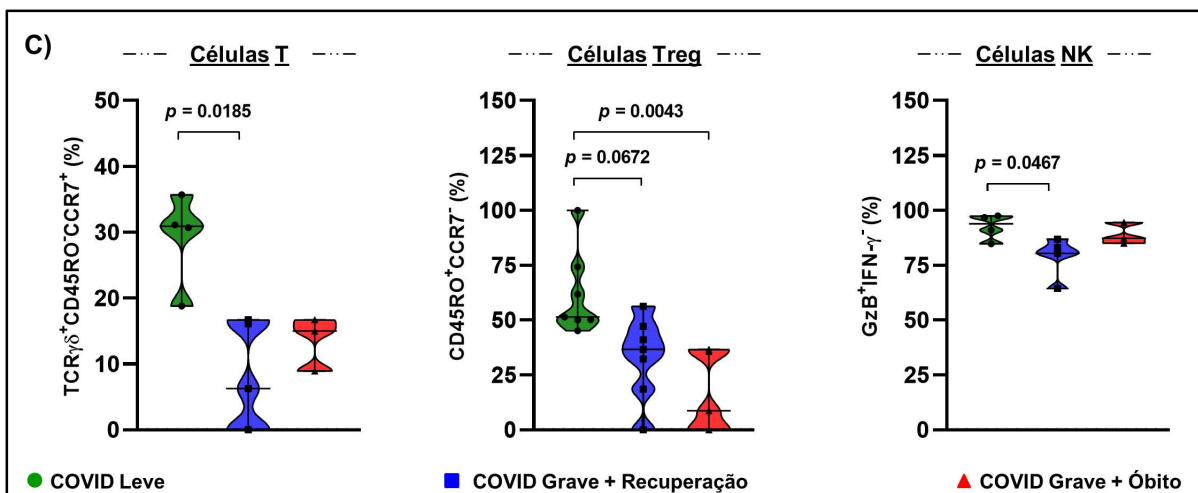


Figura 14 – Avaliação supervisionada dos dados de citometria de fluxo indica três perfis distintos de subpopulações de linfócitos entre pacientes com tumores sólidos e diferentes apresentações clínicas da COVID-19. Células mononucleares de sangue periférico foram descongeladas, estimuladas por quatorze horas com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (apenas no caso do painel “Intracelular”), incubadas com brefeldina A durante quatro horas, e marcadas com diferentes painéis de anticorpos para citometria, segundo descrito em Material e Métodos. As estratégias de análise das populações e subpopulações de linfócitos também estão descritas em Material e Métodos. Representação das populações com frequências elevadas entre indivíduos do grupo COVID Grave + Óbito (A), COVID Grave + Recuperação (B), e COVID Leve (C). Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Os dados estão apresentados como mediana e seus respectivos intervalos de confiança de 95% e foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com correção para múltiplas comparações. *p*-valores inferiores a 0,1 estão representados nos gráficos. Painel “Exaustão”: *n* = 7 (COVID Leve); *n* = 7 (COVID Grave + Recuperação); *n* = 5 (COVID Grave + Óbito). Painel “Intracelular”: *n* = 4 (COVID Leve); *n* = 5 (COVID Grave + Recuperação); *n* = 3 (COVID Grave + Óbito).

Fonte: Autoria própria.

Curiosamente, pacientes com tumores sólidos que faleceram em decorrência da COVID-19 apresentaram frequências mais elevadas de células B, e células T expressando os marcadores CXCR5 e CCR6, que estão associadas tanto à função de células foliculares quanto ao perfil $T_H17^{64,65}$. Além disso, esses pacientes apresentaram diversas subpopulações de células B, células T $TCR\gamma\delta^+$ e $TCR\gamma\delta^-$ expressando marcadores associados aos processos de exaustão e proliferação, algumas das quais ainda apresentavam capacidade de produção de IL-10, IFN- γ , ou IL-17A (Figura 14A).

Entre pacientes que tiveram COVID-19 grave mas se recuperaram da doença, destacaram-se múltiplas populações de células NK, desde as ativadas, até as que apresentavam diferentes capacidades de produção de Granzima B, IL-10, IL-17A, e IFN- γ . Além disso, esses pacientes apresentaram frequências mais elevadas de linfócitos $TCR\gamma\delta^+$ e

células T regulatórias produtoras de IL-10 (**Figura 14B**).

Já entre pacientes que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19, observou-se a maior frequência de células T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ *naïve*, células NK produtoras de Granzima B, e células T regulatórias efectoras de memória (**Figura 14C**).

Por fim, associamos os parâmetros diferencialmente expressos entre os grupos de pacientes oncológicos com diferentes desfechos da COVID-19 para a geração de *heatmaps* baseados em agrupamentos não-supervisionados, e para a Análise de Componentes Principais (PCA). A fim de reduzir possíveis vieses, pareamos amostras dos ensaios referentes aos perfis imunes humoral e celular, selecionando apenas os fatores imunes solúveis que apresentaram *p-valores* inferiores a 0,05 na comparação entre os grupos. Os parâmetros comorbidades, presença ou ausência de leucopenia na data do diagnóstico da COVID-19, tratamento antitumoral um mês antes do diagnóstico da COVID-19, pontuação *ECOG*, estadiamento tumoral, e sexo do indivíduo também foram utilizados nesta análise.

Os resultados abaixo foram obtidos a partir dos parâmetros diferencialmente expressos entre pacientes com tumores hematológicos dos grupos COVID Leve e COVID Grave + Óbito, considerando *p-valores* inferiores a 0,05 (**Figura 15**).

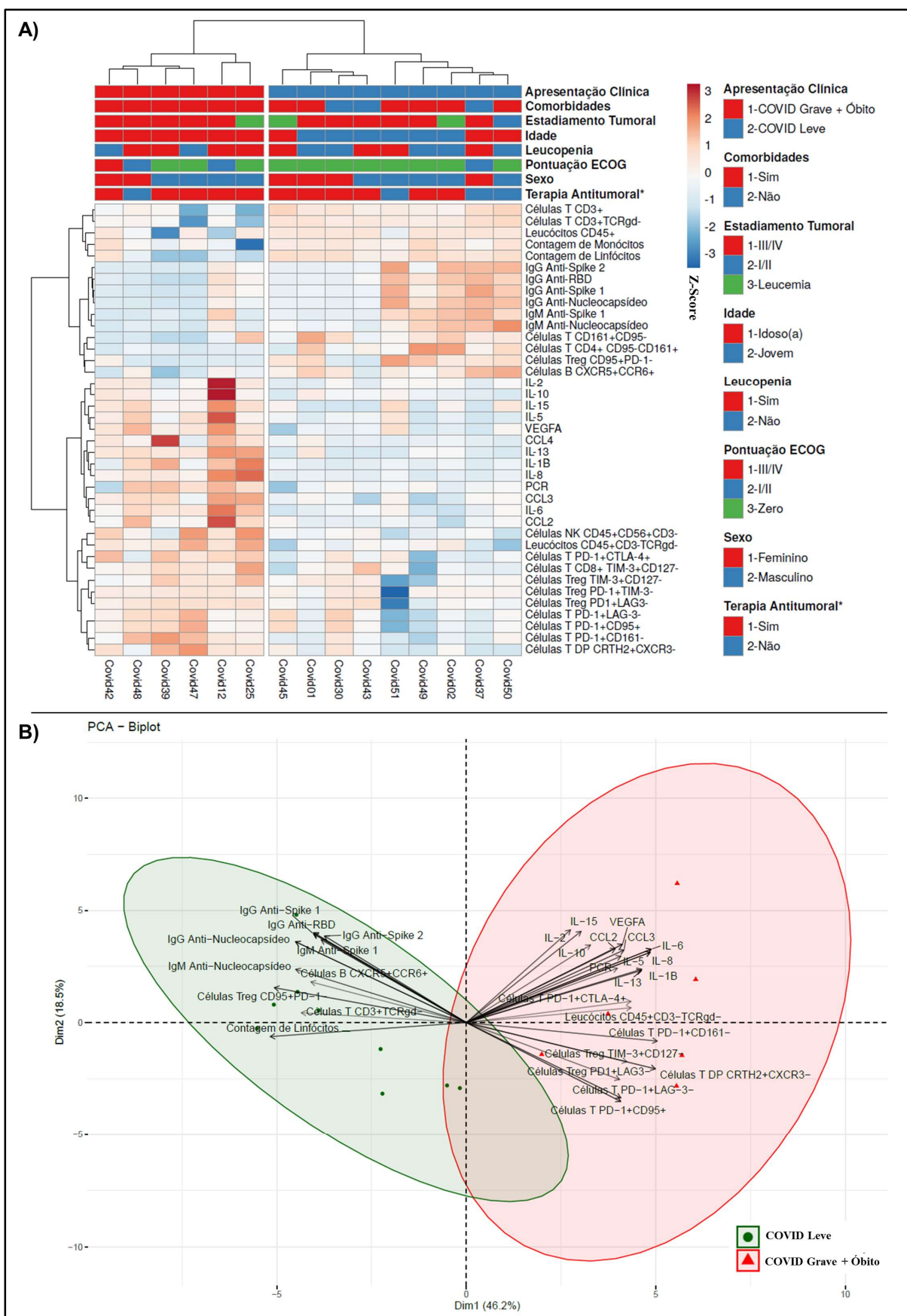


Figura 15 – Fatores imunes solúveis e celulares foram os principais determinantes do desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores hematológicos. Dados referentes às dosagens de analitos solúveis e fatores celulares com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve (n = 9) e COVID Grave + Óbito (n = 6)

(considerando *p-valores* iguais ou inferiores a 0,05), foram transformados por $\text{Ln}(X+1)$ e analisados com algoritmos de agrupamentos não-supervisionados. Para a construção do mapa de calor (A), tanto as linhas quanto as colunas foram agrupadas de acordo com a distância Manhattan e a ligação tipo Ward. Fatores categóricos como idade, uso de terapia antitumoral, comorbidades, pontuação ECOG, sexo, presença de leucopenia e estadiamento tumoral também foram considerados para a análise. A análise de componentes principais (B) demonstra a distribuição dos indivíduos de acordo com a gravidade da COVID-19, assim como os principais fatores que contribuíram para explicar as variâncias observadas nas dimensões um (Dim1) e dois (Dim2). Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos.

*Considerando até um mês antes do diagnóstico da infecção por *SARS-CoV-2*.

Fonte: Autoria própria.

Apesar dos diversos parâmetros clínicos categóricos utilizados na análise de agrupamentos não supervisionada, as principais diferenças observadas estavam associadas aos parâmetros imunológicos investigados neste trabalho. Observou-se a formação de dois grupos com características distintas, onde aqueles indivíduos que, próximo ao diagnóstico da COVID-19, apresentaram maior produção de anticorpos, contagem de linfócitos e leucócitos, e frequências de células T expressando o marcador CD161 e células B ativadas e diferenciadas, tiveram apenas a forma leve da doença. Por outro lado, pacientes que, no mesmo contexto, apresentaram concentrações elevadas de parâmetros imunes solúveis de forma geral, e maior frequência de células NK, células T duplo-positivas expressando o marcador CRTH2, e linfócitos com marcadores associados à exaustão, tiveram maior chance de óbito (**Figura 15A**).

A análise de componentes principais também trouxe resultados semelhantes, onde pacientes com diferentes desfechos da COVID-19 foram mapeados em duas áreas bastante distintas. Observa-se, ainda, que os fatores de maior variabilidade nos grupos COVID Leve e COVID Grave + Óbito foram essencialmente os mesmos encontrados na análise de agrupamentos não supervisionada. Adicionalmente, análises de componentes principais ainda indicam fatores que apresentam correlações positivas ou negativas. No caso acima, observaram-se quatro quadrantes bem definidos, onde, de forma geral, contagens de linfócitos se correlacionaram negativamente com a concentração de citocinas, e a produção de anticorpos se correlacionou negativamente com a presença de células expressando marcadores associados a perfis de exaustão (**Figura 15B**).

De forma análoga, realizamos as análises de componentes principais e de agrupamentos não-supervisionadas dos parâmetros diferencialmente expressos entre pacientes com tumores

sólidos, considerando *p-valores* iguais ou inferiores a 0,05. Visto que a plataforma ClustVis adiciona dados imputados a células vazias (a fim de evitar valores indisponíveis), os dados utilizados para as análises abaixo não levaram em consideração o painel “Intracelular”, cujo número de pacientes era menor (**Figura 16**).

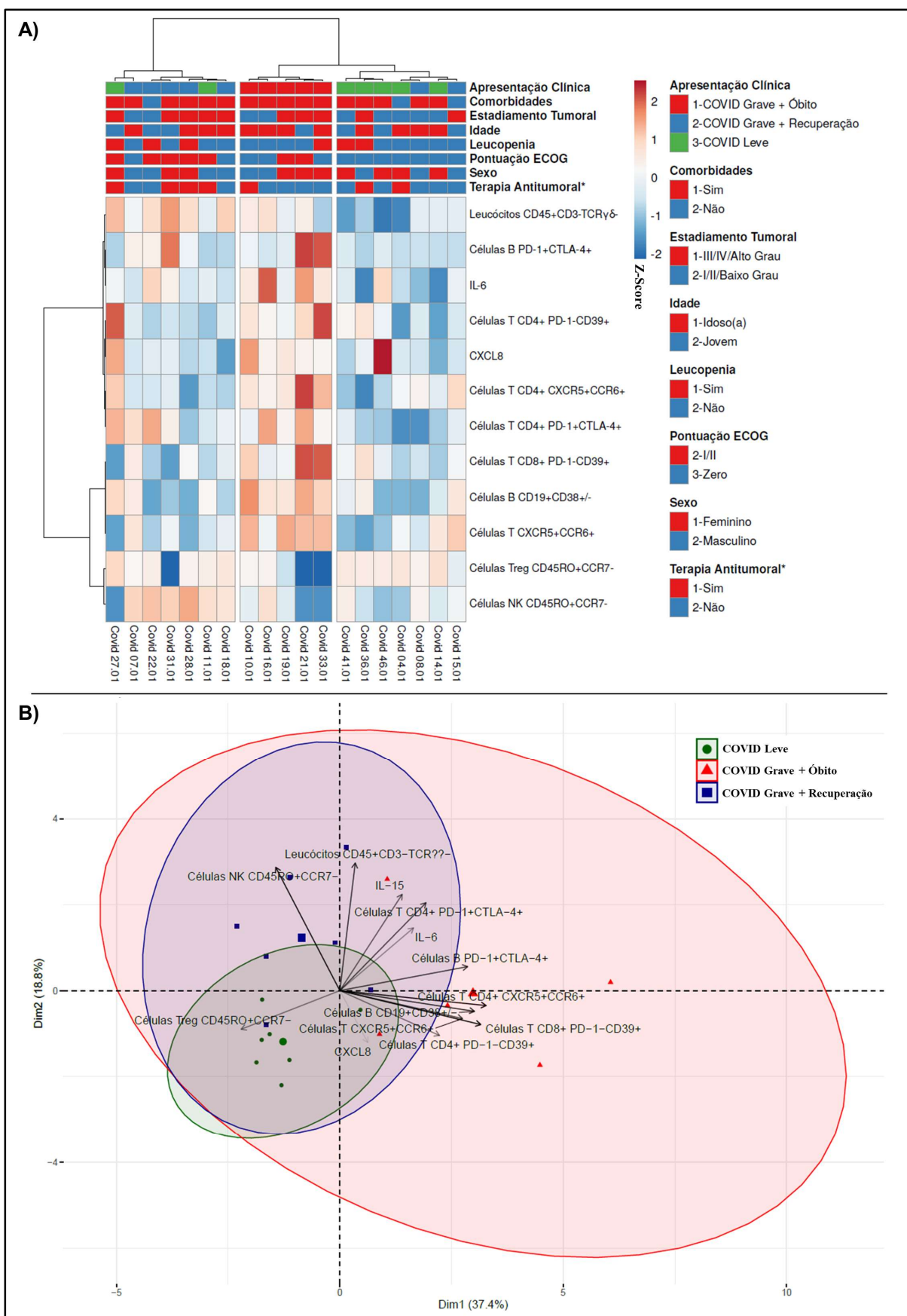


Figura 16 – Fatores imunes solúveis e celulares foram os principais determinantes do desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos. Dados referentes às dosagens de analitos solúveis e fatores celulares com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve (n = 7), COVID Grave + Recuperação (n = 7) e

COVID Grave + Óbito (**n = 5**) (considerando *p-valores* iguais ou inferiores a 0,05), foram transformados por **Ln(X+1)** e analisados com algoritmos de agrupamentos não-supervisionados. Para a construção do mapa de calor (**A**), tanto as linhas quanto as colunas foram agrupadas de acordo com a distância Canberra e a ligação tipo Ward. Fatores categóricos como idade, uso de terapia antitumoral, comorbidades, pontuação ECOG, sexo, presença de leucopenia, e estadiamento tumoral também foram considerados para a análise. A análise de componentes principais (**B**) demonstra a distribuição dos indivíduos de acordo com a gravidade da COVID-19, assim como os principais fatores que contribuíram para explicar as variâncias observadas nas dimensões um (Dim1) e dois (Dim2). Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos.

*Considerando até um mês antes do diagnóstico da infecção por *SARS-CoV-2*.

Fonte: Autoria própria.

No caso de pacientes com tumores sólidos, observou-se a formação de três agrupamentos baseados nos parâmetros imunes avaliados, sem que variáveis categóricas apresentassem uma clara segregação entre os pacientes e seus respectivos desfechos da COVID-19. Em um dos grupos observamos a presença de quase todos os pacientes que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19, assim como alguns dos que se recuperaram da doença grave. Nesse grupo destacaram-se a presença elevada de células NK efectoras, assim como células T regulatórias efectoras de memória (**Figura 16A**).

Num segundo grupo, que reuniu a maioria dos pacientes que se recuperaram da forma grave da COVID-19, além de um indivíduo que apresentou a forma leve da doença, destacaram-se a frequência elevada de “leucócitos não-T”, Células NK efectoras, e a produção elevada de IL-15 e IL-6, porém baixa de CXCL8 (**Figura 16A**).

No grupo onde ficaram todos os pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19, destacaram-se não apenas a produção elevada de IL-15, IL-6 e, especialmente, CXCL8, mas também frequências mais altas de células B, células T positivas para CD39, e células T e B com marcadores associados a processos de exaustão (**Figura 16A**).

Já a análise de componentes principais revelou bastante sobreposição entre os grupos, mas, ainda assim, destacou fatores com associações negativas. Dentre eles, destacaram-se a interação negativa entre a frequência células T regulatórias efectoras de memória e a frequência de células com marcadores associados à exaustão (**Figura 16B**).

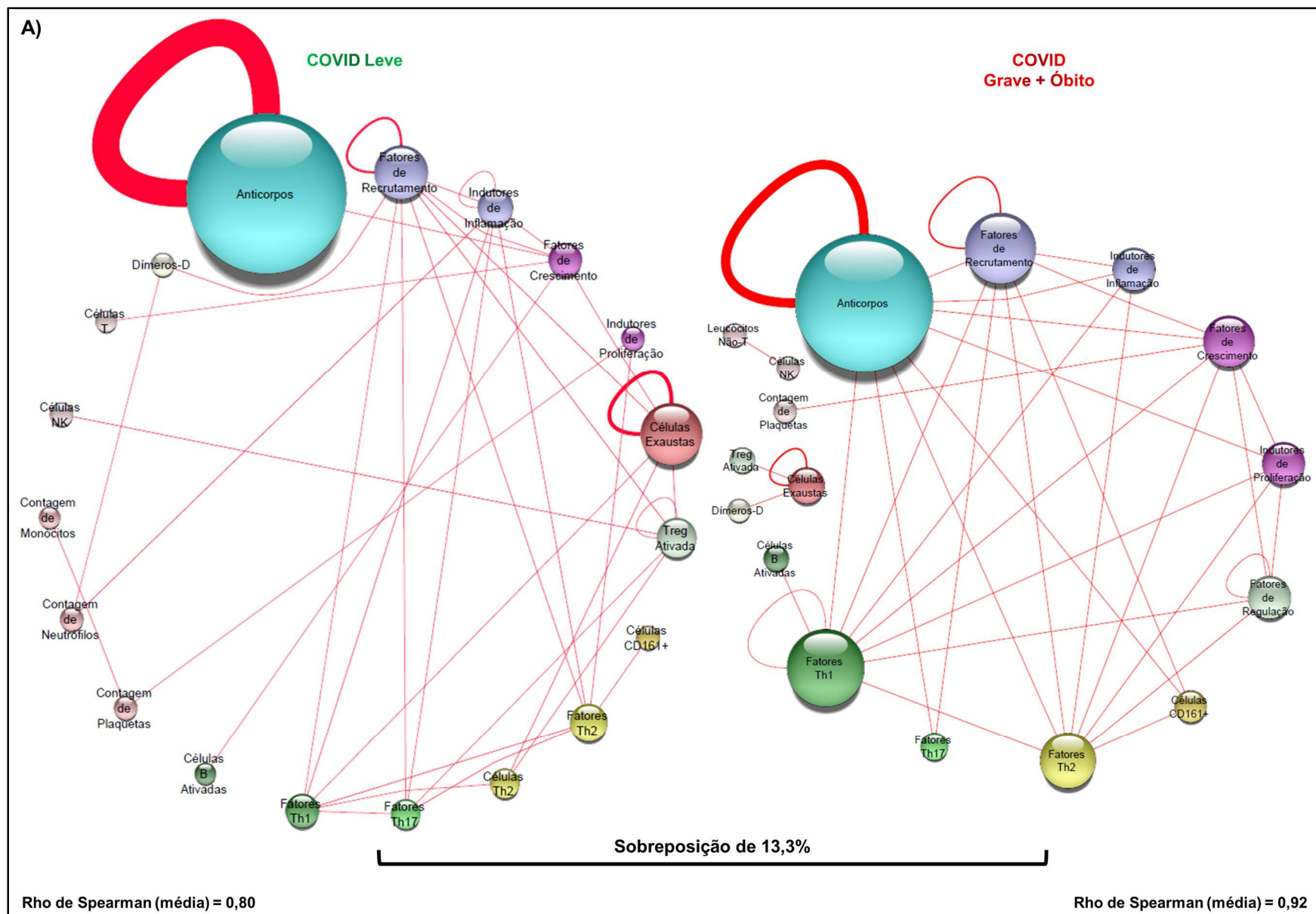
A fim de aprofundarmos a investigação, procedemos ao estudo de possíveis mecanismos envolvidos na progressão da COVID-19 em pacientes oncológicos.

4.3 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNES DA COVID-19 EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

Muito embora vários estudos sobre os mecanismos da progressão da COVID-19 tenham sido publicados, poucos possuem foco em populações com câncer. Até então, o principal mecanismo associado à COVID-19 grave é a síndrome de liberação de citocinas, na qual se observa papel predominante de IFN- γ , IL-6, IL-12A e TNF α ²⁸. Visto que não encontramos diferenças entre as dosagens plasmáticas dessas citocinas – à exceção da IL-6 – e a possibilidade de que outros mecanismos estejam envolvidos na progressão da doença entre pacientes oncológicos, verificamos como os diversos parâmetros avaliados nesse trabalho se correlacionam.

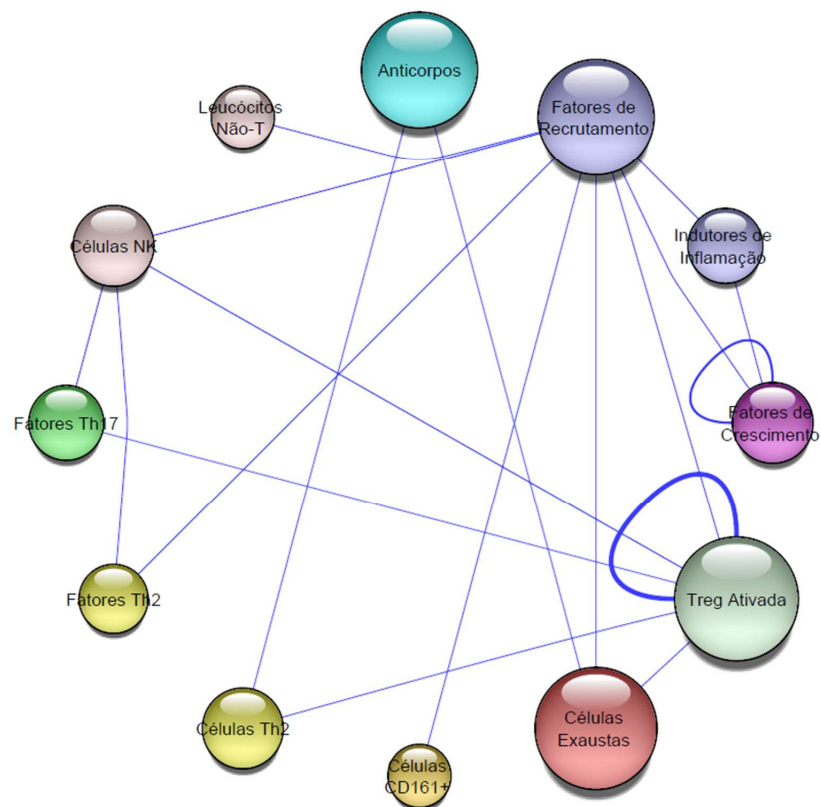
Para tanto, foram construídas matrizes de correlação de Spearman, onde as interações com *p-valores* superiores a 0,05 foram sombreadas, destacando, assim, as demais interações (**Apêndices 1 e 2**). As redes de correlação, por sua vez, foram construídas considerando apenas as correlações com *p-valor* inferior a 0,05. Em ambos os casos, utilizamos como base um agregado de resultados, que consistiu em todos os fatores solúveis avaliados no plasma, as contagens de neutrófilos, monócitos e plaquetas, e todas as populações celulares diferencialmente expressas de acordo com os ensaios de citometria de fluxo.

Iniciamos com a análise dos parâmetros observados nos grupos de pacientes com tumores hematológicos, considerando apenas indivíduos que apresentavam amostras pareadas das análises dos perfis humoral e celular. Devido à grande quantidade de correlações com *p-valores* inferiores a 0,05 encontrada, parâmetros com características semelhantes foram agrupados para a construção das redes de correlação, que ainda foram segregadas a fim de destacar com maior clareza apenas as correlações positivas, ou apenas as negativas (**Figura 17**). Matrizes de correlação com as todas as interações entre fatores individuais podem ser observadas ao final deste trabalho (**Apêndices 1 e 2**).

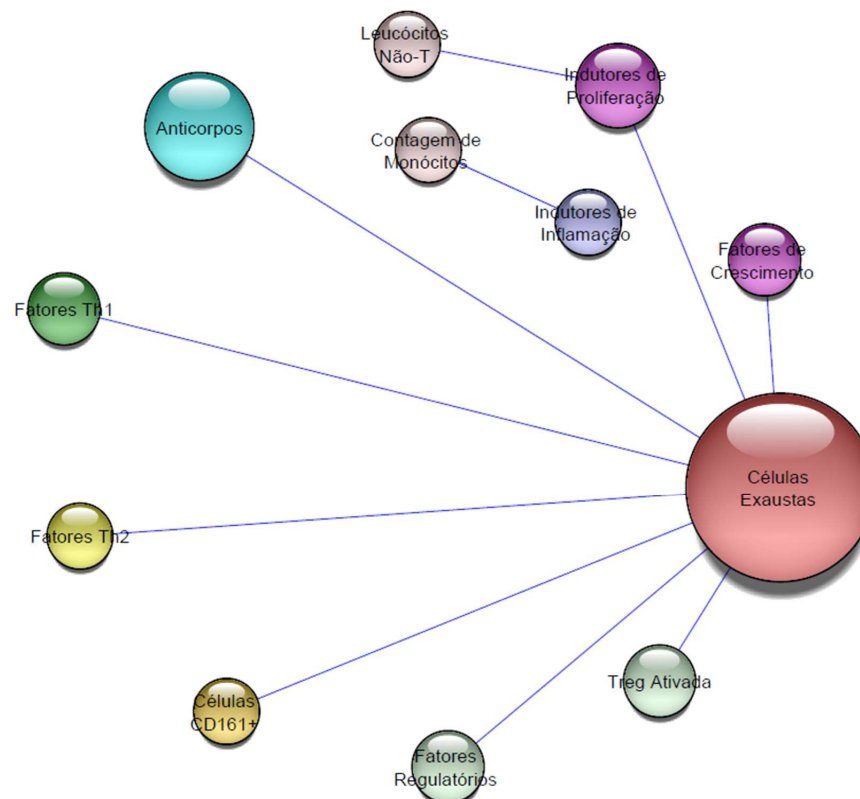


B)

COVID Leve



COVID Grave + Óbito



Sobreposição de 12,5%

Rho de Spearman (média) = -0,78

Rho de Spearman (média) = -0,93

Figura 17 – Análises de correlação indicam que a resposta humoral ineficiente está associada ao óbito entre pacientes com tumores hematológicos. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05), foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, evidenciando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05. Essas interações foram utilizadas para a construção de redes de correlação positivas (representadas por linhas vermelhas) e negativas (representadas por linhas azuis), onde o tamanho das esferas aumenta de acordo com o número de interações realizadas pelo grupo de fatores, e a espessura das linhas em *loop* indica o número de correlações que os fatores realizam entre si. Representação das redes de correlações positivas do grupo COVID Leve e COVID Grave + Óbito **(A)**. Representação das redes de correlações negativas do grupo COVID Leve e COVID Grave + Óbito **(B)**. Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Fatores com características semelhantes foram agrupados, sendo que: “**Anticorpos**” se referem a IgA, IgG, e IgM específicos contra as proteínas *Nucleocapsid*, *Spike 1*, *Spike 2* ou *Receptor Binding Domain* do *SARS-CoV-2*; “**Células B Ativadas**” são células CD19⁺CD38⁺/CXCR5⁺CCR6⁺; “**Células CD161⁺**” são células CD3⁺CD161⁺CD95⁻ ou células CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD95⁻; “**Células Exaustas**” se referem a qualquer linfócito positivo para os marcadores PD-1, CLTA-4, ou TIM-3, excetuando-se células T_{reg}; “**Células NK**” são células CD45⁺CD56⁺CD3⁻; “**Células Th2**” são células CD3⁺CD4⁺CD8⁻CRTH2⁺CXCR3⁻; “**Fatores de Crescimento**” correspondem às moléculas CSF3, FGF2, PDGFB e VEGFA; “**Fatores de Recrutamento**” correspondem às moléculas CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CXCL8 e CXCL10; “**Fatores Regulatórios**” correspondem às moléculas IL-1RN e IL-10; “**Fatores Th17**” dizem respeito à IL-17A; “**Fatores Th2**” correspondem às moléculas IL-4, IL-5 e IL-13; “**Indutores de Inflamação**” representam IL-1β, IL-6 e Proteína C Reativa; “**Indutores de Proliferação**” correspondem à IL-2, IL-7 e IL-9; “**Leucócitos ‘Não-T’**” são células CD45⁺CD3⁻TCRγδ⁻; “**T_{reg} Ativada**” são células CD4⁺CD25⁺CD127^{low} PD-1⁺, CD95⁺, ou TIM-3⁺; “**Contagem**” diz respeito ao número de Monócitos, Neutrófilos ou Plaquetas por mm³ de sangue. **n = 9** (COVID Leve) e **n = 6** (COVID Grave + Óbito).

Fonte: Autoria própria.

A comparação entre as redes de correlação dos grupos COVID Leve e COVID Grave + Óbito demonstrou padrões diferentes de interações entre anticorpos, células em geral, e fatores solúveis, com pouca sobreposição entre as redes dos dois grupos (**Figura 17**). Na rede de correlações positivas, observou-se uma grande queda no número de interações entre diferentes tipos de anticorpos na comparação entre pacientes que apresentaram COVID-19 leve e os que vieram a óbito em decorrência da doença (**Figura 17A**). Além disso, a participação de diversos grupos celulares é muito mais evidente entre pacientes que obtiveram desfechos mais favoráveis, enquanto indivíduos que vieram a óbito apresentaram redes intrincadas entre diversos fatores imunes solúveis, incluindo diversas quimiocinas e indutores de inflamação, como IL-6, e Proteína C Reativa (**Figura 17A, Apêndice 1**). Outro destaque foram as células T regulatórias ativadas, que apresentaram muito mais correlações entre indivíduos com COVID-19 leve, em relação aos que faleceram (**Figura 17A**).

Já na rede de correlações negativas, ficou destacado, em ambos os casos, a relação oposta entre a presença de células exaustas e a produção de anticorpos (**Figura 17B**). Células exaustas, no entanto, pareceram exercer influência muito mais abrangente na resposta imune de pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19. Por outro lado, em indivíduos que apresentaram apenas COVID-19 leve, a importância de células T regulatórias ativadas foi destacada (**Figura 17B**). Além disso, de forma geral, a força das correlações – positivas ou negativas – foram mais elevadas entre pacientes do grupo COVID Grave + Óbito do que no grupo COVID Leve (**Figura 17**).

A seguir, a mesma metodologia foi utilizada para avaliar as redes de interação entre os diferentes grupos de pacientes com tumores sólidos (**Figura 18**).

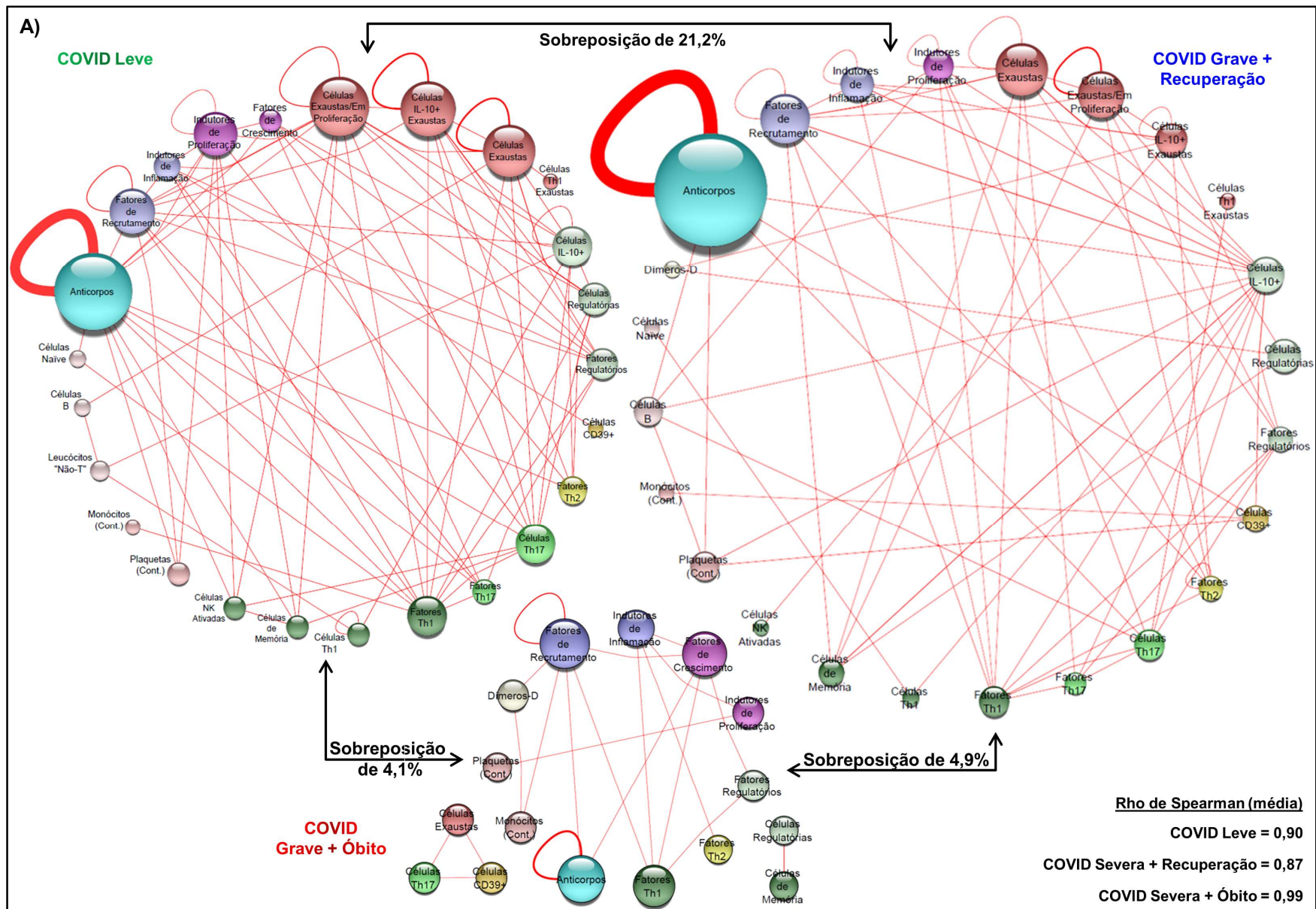


Figura 18 – Análises de correlação indicam que a falta de regulação imune eficiente se associa ao óbito entre pacientes com tumores sólidos. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve, COVID Grave + Recuperação e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05) foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, evidenciando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05. As interações destacadas foram utilizadas para a construção de redes de correlação positivas (representadas por linhas vermelhas) e negativas (representadas por linhas azuis), onde o tamanho das esferas aumenta de acordo com o número de interações realizadas pelo grupo de fatores. Representação das redes de correlação positivas relativas aos dados pareados humorais e celulares de pacientes do grupo COVID Leve, COVID Grave + Recuperação, e COVID Grave + Óbito **(A)**. Representação das redes de correlação negativas relativas aos dados pareados humorais e celulares de pacientes do grupo COVID Leve, COVID Grave + Recuperação, e COVID Grave + Óbito **(B)**. Os grupos de pacientes foram definidos a partir da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. Fatores com características semelhantes foram agrupados, sendo que: “**Anticorpos**” se referem a IgA, IgG, e IgM específicos contra as proteínas *Nucleocapsid*, *Spike 1*, *Spike 2* ou *Receptor Binding Domain* do *SARS-CoV-2*; “**Células B**” são células CD45⁺CD19⁺CD38⁺; “**Células CD39**” são células CD39⁺PD-1⁻ CD4⁺ ou CD8⁺; “**Células de Memória**” são células CD8⁺CD45RO⁺CCR7⁺ ou CD56⁺CD45RO⁺CCR7⁺; “**Células Naive**” representam células T TCRγδ⁺CD45RO⁻CCR7⁺; “**Células Exaustas**” se referem a qualquer linfócito positivo para os marcadores PD-1, CLTA-4, TCF-1 ou TOX, excetuando-se células T_{reg}; “**Células Exaustas/Em Proliferação**” se referem a qualquer linfócito PD-1⁺Ki-67⁺, excetuando-se células T_{reg}; “**Células IL-10⁺**” representam qualquer linfócito positivo para IL-10; “**Células IL-10⁺ Exaustas**” representam qualquer linfócito PD-1⁺IL-10⁺; “**Células NK Ativadas**” são células CD56⁺CD3⁺GzB⁺IFN-γ⁺; “**Células Regulatórias**” são células CD4⁺CD25⁺CD127^{low}CD45RO⁺CCR7⁻ ou células CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺IL-10⁺GzB⁻; “**Células Th1**” são células CD56⁺IFN-γ⁺GzB⁻ ou CD56⁺IFN-γ⁺GzB⁺; “**Células Th1 Exaustas**” são células T TCRγδ⁺IFN-γ⁺PD-1⁺; “**Células Th17**” são células CD56⁺IL-17A⁺GzB⁻ ou Células T CXCR5⁺CCR6⁺; “**Fatores de Crescimento**” correspondem às moléculas CSF3, FGF2, PDGFB e VEGFA; “**Fatores de Recrutamento**” correspondem às moléculas CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CXCL8 e CXCL10; “**Fatores Regulatórios**” correspondem às moléculas IL-1RN e IL-10; “**Fatores Th1**” correspondem às moléculas IFN-γ, IL-12A, IL-15 e TNFα; “**Fatores Th17**” dizem respeito à IL-17A; “**Fatores Th2**” correspondem às moléculas IL-4, IL-5 e IL-13; “**Indutores de Inflamação**” representam IL-1β, IL-6 e Proteína C Reativa; “**Indutores de Proliferação**” correspondem à IL-2, IL-7 e IL-9; “**Leucócitos ‘Não-T’**” são células CD45⁺CD3⁺TCRγδ⁻; “**Cont.**” diz respeito à contagem de Monócitos, Neutrófilos ou Plaquetas por mm³ de sangue. **n = 7** (COVID Leve); **n = 7** (COVID Grave + Recuperação); **n = 5** (COVID Grave + Óbito).

Fonte: Autoria própria.

Observa-se que as redes de correlação entre pacientes dos grupos COVID Leve e COVID Grave + Recuperação possuem maior grau de sobreposição em relação aos indivíduos cujo desfecho da doença foi o óbito. No geral, observamos uma queda gradual na influência de células e fatores regulatórios de acordo com o aumento da gravidade da COVID-19, tanto nas redes de correlações positivas quanto nas de correlações negativas (**Figura 18**). Fatores regulatórios (como IL-1RN e IL-10), ou células T regulatórias de forma geral apresentaram interações com células de diversos perfis diferentes – das *naïve* às exaustas, nos três grupos avaliados. Por outro lado, pacientes que tiveram desfechos positivos da COVID-19 apresentaram diversas interações entre mecanismos de regulação imune e células exaustas, as quais estão ausentes nos pacientes cujo desfecho foi o óbito.

Outras interações de destaque incluíram anticorpos, onde observa-se o aumento do número de interações entre as diversas classes de imunoglobulinas na comparação dos grupos COVID Leve e COVID Grave + Recuperação, com redução entre pacientes do grupo COVID Grave + Óbito (**Figura 18A**). Além disso, de forma semelhante ao observado entre pacientes com tumores hematológicos, indivíduos com tumores sólidos também apresentaram interações negativas entre anticorpos e células exaustas, independente do desfecho da COVID-19 (**Figura 18B**). Por fim, outro fator em comum foi o aumento da força das correlações – positivas e negativas – entre pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19.

Visto a vasta gama de diferenças observadas entre diversos parâmetros imunes de pacientes diferentes desfechos da COVID-19, prosseguimos ao estudo de modelos preditivos.

4.4 PREDIÇÃO DO DESFECHO DA COVID-19 EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

A fim de identificar fatores capazes de prever o resultado da COVID-19 em pacientes oncológicos ainda nos primeiros dias após a confirmação do diagnóstico da infecção por *SARS-CoV-2*, recorremos à plataforma *MetaboAnalyst*. Todos os dados analisados neste trabalho foram utilizados para a construção de modelos preditivos, mas, devido ao maior número de amostras disponíveis nos ensaios de dosagem da concentração de fatores imunes circulantes no plasma, apresentamos os modelos mais robustos obtidos. Além disso, segregamos os grupos entre “Pacientes Recuperados” e “Pacientes Falecidos” baseado no desfecho da COVID-19 (**Figura 19**).

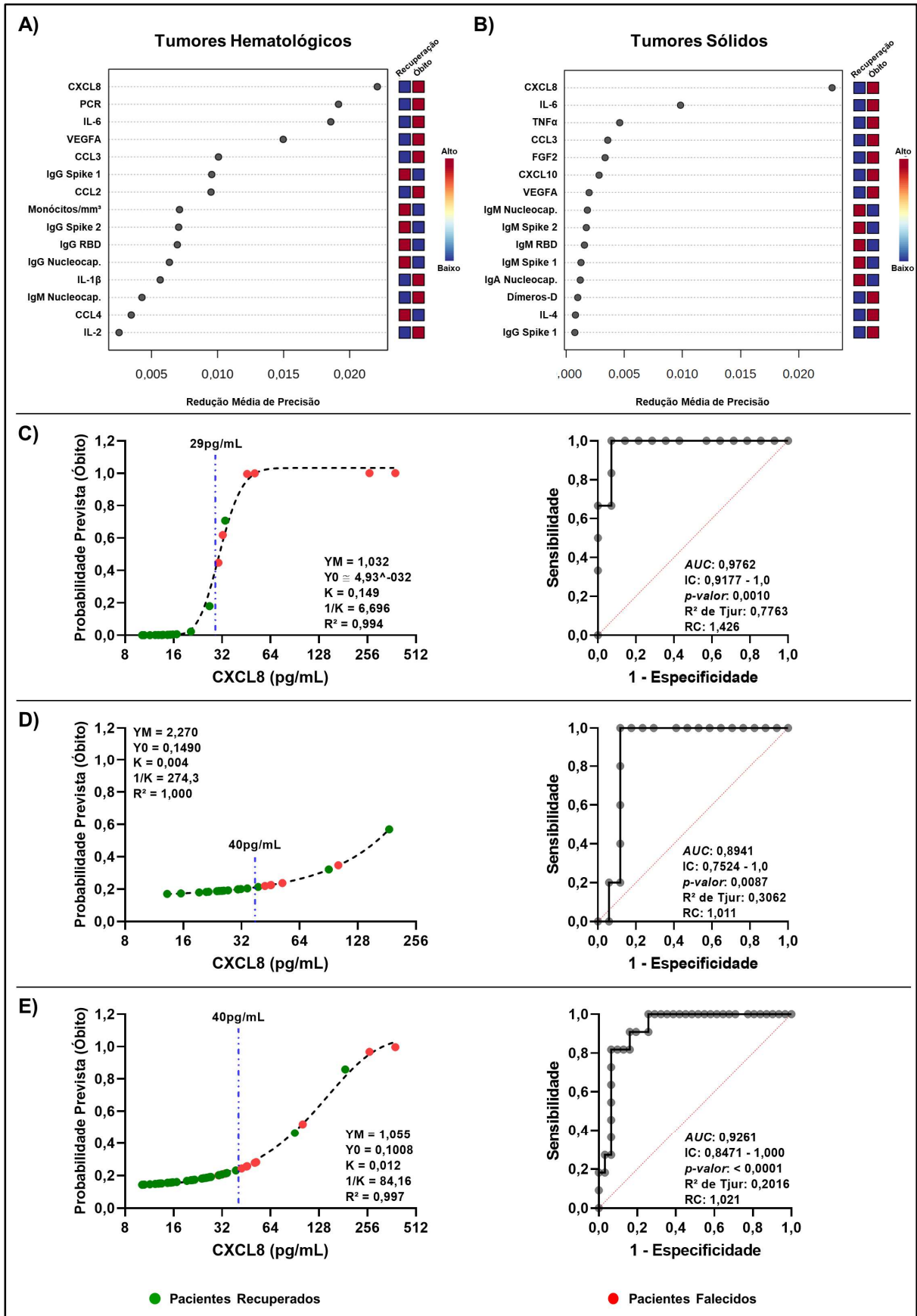


Figura 19 – Modelos de Florestas Randômicas e de Curvas ROC indicam CXCL8 como um potencial preditor de morte para pacientes oncológicos infectados pelo *SARS-CoV-2*. Os dados de prontuários eletrônicos e de ensaios *multiplex* para a detecção de analitos solúveis e anticorpos foram utilizados como base

para a análise de Florestas Randômicas ou a construção de curvas ROC. Os gráficos demonstram a importância de cada fator para segregar os desfechos recuperação e óbito entre pacientes com tumores hematológicos (A) ou tumores sólidos (B). As curvas ROC representam a Área sob a Curva, os intervalos de confiança de 95% das áreas, os *p-valores*, o R^2 de Tjur, e a razão de chance de óbito para pacientes com tumores hematológicos (C), tumores sólidos (D), ou pacientes oncológicos de forma geral (E). Os gráficos de linha representam a influência da concentração dos fatores selecionados na probabilidade de morte do paciente, enquanto as linhas azuis indicam pontos de corte sugeridos, de acordo com o modelo utilizado. Pacientes que sobreviveram estão representados em verde, e os que faleceram, em vermelho. Aos dados foi aplicado o modelo de crescimento de Gompertz, que melhor se adequou à sua distribuição, e cujas variáveis estão representadas junto aos gráficos. Em (A) e (C), $n = 14$ para o desfecho recuperação e $n = 6$ para o desfecho óbito; Em (B) e (D), $n = 17$ para o desfecho recuperação e $n = 5$ para o desfecho óbito; Em (E), $n = 31$ para o desfecho recuperação e $n = 11$ para o desfecho óbito. Os modelos utilizados são explicados em detalhes em Material e Métodos. Os grupos de pacientes foram definidos a partir do tipo de tumor (sólido ou hematológico) e da gravidade da COVID-19, segundo descrito em Material e Métodos. IC = Intervalo de Confiança de 95%; PCR = Proteína C Reativa; RC = Razão de Chance.

Fonte: Autoria própria.

Os primeiros gráficos representam, em ordem decrescente, os parâmetros mais importantes para segregar pacientes cujo desfecho da COVID-19 cujo desfecho foi o óbito. Observa-se que, entre pacientes com tumores hematológicos, os parâmetros mais importantes para classificar diferencialmente indivíduos que se recuperaram da doença foram a produção de anticorpos IgG contra proteínas do *SARS-CoV-2*. Por outro lado, pacientes recém-diagnosticados apresentaram maior risco de óbito baseado na concentração elevada de fatores relacionados ao recrutamento de células imunes e inflamação de fase inicial, como as quimiocinas CXCL8, CCL3 e CCL2, o fator de crescimento VEGFA, as citocinas IL-1 β e IL-6, e a proteína C reativa (Figura 19A-B).

De forma semelhante ao observado em pacientes com tumores hematológicos, o modelo de *Random Forests* também apontou a produção de anticorpos contra proteínas virais como um importante fator para a predição da recuperação dos pacientes com tumores sólidos, enquanto fatores de recrutamento e ativação celular, como CXCL8, IL-6, CXCL10, VEGFA e TNF α indicaram mau prognóstico entre os recém-diagnosticados com COVID-19.

Um segundo tipo de modelo, baseado em *Receiver Operating Characteristic curves* (chamados aqui de curvas ROC), foi construído utilizando os dados supracitados. Dado o grande número de parâmetros com alta capacidade preditiva – definida aqui pela área abaixo da curva (AUC) de 0,85 ou mais – selecionamos apenas um fator com maior valor preditivo e que melhor segregaria os grupos (Figura 19C-E).

A partir do modelo matemático foram construídos os gráficos de probabilidade prevista e o de especificidade *versus* sensibilidade, classicamente utilizado em modelos de curvas ROC.

Os gráficos de probabilidade prevista determinam, a partir da dosagem de um determinado parâmetro obtido no sangue do indivíduo, qual a probabilidade do desfecho “óbito”. No gráfico também foram adicionados pontos de corte sugeridos, capazes de determinar o desfecho óbito entre pacientes da presente coorte. Já os gráficos para curvas ROC apresentam: **i)** os dados de área abaixo da curva; **ii)** o intervalo de confiança de 95% da área calculada; **iii)** o *p-valor* (em comparação a um modelo cuja área abaixo da curva seria de valor 0,5); **iv)** o R^2 de Tjur, como indicativo de correlação entre o parâmetro e o desfecho; e **v)** a Razão de Chance, levando-se em consideração cada acréscimo de 1pg/mL do analito avaliado.

De acordo com o modelo de curvas ROC, CXCL8 e VEGFA foram dois dos fatores com maior área abaixo da curva, considerando apenas pacientes com tumores hematológicos e diagnóstico recente de infecção por *SARS-CoV-2* (**Figura 19C e dados não apresentados**). Já para pacientes com tumores sólidos recém-diagnosticados com *SARS-CoV-2*, CXCL8 e IL-6 apresentaram as áreas abaixo da curva mais elevadas (**Figura 19D e dados não apresentados**). Entretanto, como observa-se nos gráficos de probabilidade prevista, os pontos de corte que separam pacientes com desfechos favoráveis ou desfavoráveis são bastante próximos (**Figura 19D**). Ainda assim, observou-se que CXCL8 e IL-6 possuem as maiores áreas sob a curva quando consideramos pacientes oncológicos de forma geral (**Figura 19E e dados não apresentados**).

5. DISCUSSÃO

Durante a execução deste trabalho reunimos diversas informações acerca da resposta imune de pacientes com câncer contra a infecção pelo *SARS-CoV-2*. Muito embora não tivéssemos à nossa disposição anticorpos para realizar avaliações aprofundadas sobre algumas populações celulares, identificamos características importantes do estado geral da resposta imune de pacientes oncológicos com COVID-19.

Visto a ampla gama de resultados encontrados, decidimos por segregar a discussão em subtópicos e realizar um apanhado geral ao final de cada seção, com o objetivo de facilitar a leitura e interpretação dos dados.

5.1 ASPECTOS COMUNS DA RESPOSTA IMUNE FRENTE AO *SARS-CoV-2* EM PACIENTES ONCOLÓGICOS

Muito embora nossos achados – assim como dados da literatura – indiquem que pacientes com tumores sólidos e tumores hematológicos apresentem perfis imunes distintos durante a COVID-19, também observamos alguns padrões em comum.

Por exemplo, nas avaliações bioquímicas e hematológicas, pacientes oncológicos não apresentaram diferenças significativas nas contagens de neutrófilos ou plaquetas – fatores associados à gravidade da COVID-19 em indivíduos da população geral⁶⁶ – independentemente do desfecho da doença (**Figura 8**). Outro fator de risco, a presença de múltiplas comorbidades⁵⁰ não foi diferente entre pacientes que sobreviveram e os que faleceram, tanto na coorte de pacientes com tumores hematológicos, quanto na de tumores sólidos. De fato, pacientes com tumores hematológicos que sobreviveram apresentaram mediana de uma comorbidade, contra 2,5 entre indivíduos que vieram a óbito ($p\text{-valor} = 0,0939$ no teste de Mann-Whitney e $p\text{-valor} = 0,1778$ no teste exato de Fisher, ao comparar indivíduos com até uma comorbidade contra os que possuíam duas ou mais comorbidades). Já entre pacientes com tumores sólidos, tanto indivíduos que sobreviveram quanto os que faleceram apresentaram mediana de duas comorbidades ($p\text{-valor} = 0,7447$ no teste de Mann-Whitney e $p\text{-valor} > 0,9999$ no teste exato de Fisher, ao comparar indivíduos com até uma comorbidade contra os que possuíam duas ou mais comorbidades). É possível que a ausência de influência das múltiplas comorbidades no presente estudo esteja relacionada exatamente às características da coorte, visto que tanto a incidência de câncer como a de comorbidades estão associadas ao avanço da idade^{50,67}. Além disso, o Brasil em particular é um país com alta

incidência de doenças cardiovasculares, pulmonares e renais crônicas, assim como de diabetes e obesidade^{67,68}. Como a coorte deste estudo foi bastante específica e predominantemente representada por indivíduos com 50 anos ou mais, é possível que a faixa de idade restrita tenha influenciado o resultado destoante do observado na população geral.

Ainda assim, outra característica em comum entre pacientes de ambas as coortes foi o estado das células mononucleares de sangue periférico. Ensaio de citometria de fluxo indicaram que a ativação excessiva e/ou exaustão são características em comum nas respostas imunes frente à infecção por *SARS-CoV-2*, independente dos indivíduos apresentarem tumores hematológicos ou tumores sólidos. Entre pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito, observou-se que há um padrão de expressão elevado dos marcadores CTLA-4, PD-1, TIM-3 e TOX, muito embora células PD-1⁺ estejam presentes em pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi mais favorável (**Figuras 12 e 13**). O aumento da expressão de marcadores associados à exaustão em células teciduais e da circulação foi descrito tanto entre pacientes da população geral diagnosticados com COVID-19, quanto aqueles que apresentam COVID-19 e câncer^{53,54,34}. Portanto, a ativação e possível exaustão de células imunes parece ser um fenômeno geral da COVID-19, independentemente de características específicas dos indivíduos.

Interessantemente, também encontramos evidências que apontam a importância da regulação da resposta imune em ambas as coortes. Diferentes populações de células T regulatórias foram encontradas tanto entre pacientes com tumores hematológicos quanto naqueles com tumores sólidos. Curiosamente, em ambas as coortes observamos indícios de quebra dos eixos de regulação exatamente entre os pacientes que vieram a óbito, muito embora esse achado seja mais evidente entre pacientes com tumores sólidos (**Figuras 17B e 18**). De toda forma, células de perfil regulatório são comuns em casos de infecção por *SARS-CoV-2*, sendo muitas vezes associadas a desfechos mais favoráveis da COVID-19, visto que existe uma queda nas proporções de células T regulatórias em pacientes com formas críticas da doença⁶⁹. Entretanto, é importante ressaltar que a presença dessas células pode variar com o tempo, afetando o desfecho da doença⁶⁹. Além disso, células regulatórias podem apresentar subpopulações distintas com diferentes habilidades de modular a resposta imunológica, como visto neste trabalho e em casos de COVID-19 na população geral^{69,70}. Nesse sentido, muito embora já tenha sido demonstrado que o uso de dexametasona é capaz de aumentar as frequências de células regulatórias em camundongos⁷¹, no presente estudo o uso da droga entre pacientes com COVID-19 grave não foi suficiente para impedir o desfecho óbito em pelo menos parte dos pacientes. Essa observação pode estar associada ao fato de que nem

sempre a maior expressão de FoxP3 em células regulatórias, oriunda do efeito da dexametasona, resulta em maior capacidade de regulação imune⁷².

Quanto aos fatores imunes solúveis, tanto pacientes com tumores sólidos quanto os com tumores hematológicos que faleceram apresentaram altas concentrações de CXCL8 e IL-6 (**Figura 9**). A citocina IL-6 é frequentemente associada à indução de febre, respostas inflamatórias e de fase inicial, além de representar um dos principais fatores associados à síndrome de liberação de citocinas observada na COVID-19 grave^{52,59}. No mesmo sentido, a CXCL8 é uma quimiocina produzida por macrófagos alveolares, células epiteliais e células do epitélio das vias aéreas, capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos e outros granulócitos. Além disso, induz a ativação e início de processos oxidativos em neutrófilos, está envolvida em na angiogênese e na permeabilidade endotelial⁷³. A CXCL8 também está associada a diversas doenças inflamatórias, como asma, fibrose cística, doença obstrutiva inflamatória crônica, e na progressão de tumores como melanoma, colorretal, mama, pâncreas, ovário e próstata⁷³, assim como na COVID-19 grave⁵³. Nossos dados apontam que a CXCL8 pode ter papel destacado na progressão da COVID-19 entre pacientes oncológicos. De fato, alguns trabalhos descreveram que subpopulações de neutrófilos associadas a desfechos desfavoráveis na COVID-19 apresentam alta expressão de CXCL8⁷⁴⁻⁷⁶.

Por outro lado, o único ensaio clínico registrado (NCT04347226) investigando o manejo farmacológico da CXCL8 com anticorpos anti-CXCL8 no contexto da COVID-19 foi interrompido no ano de 2021^{76,77}. Apesar da ausência de informações em relação à razão para a interrupção do ensaio clínico, outros mecanismos como processos oxidativos e a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) também estão associados ao agravamento de condições pulmonares, como falha respiratória e síndrome respiratória aguda grave. NETs, além de serem encontradas em concentrações mais elevadas nos pacientes com COVID-19, ainda estão envolvidas, junto à ação de plaquetas ativadas, na formação de microtrombos pulmonares, característica frequentemente observada em necropsias de pacientes que tiveram COVID-19⁷⁴⁻⁷⁶. Portanto, embora o ensaio clínico tenha sido interrompido, mecanismos associados aos neutrófilos parecem ter forte influência na progressão da COVID-19.

De forma semelhante, nossos modelos de predição indicaram a CXCL8 (além da IL-6) como fator de predição de óbito relacionado à COVID-19 entre pacientes com câncer. Curiosamente, apenas a IL-6 foi indicada como preditora de gravidade e morte em estudos com indivíduos da população geral acometidos pela COVID-19^{52,78}. No entanto, as quimiocinas CXCL8 e CCL7 já foram indicadas como boas preditoras de risco de internação em UTI entre pacientes da população geral⁷⁹. Levando-se em consideração as análises de

curvas ROC, tanto IL-6 quanto CXCL8 podem ser importantes preditores de morte, além de indicarem que a inflamação de fase inicial está envolvida na progressão da COVID-19 em pacientes oncológicos (**Figura 19 e dados não apresentados**). Nesse contexto, é importante lembrar que alguns indivíduos são resistentes à ideia de se vacinarem, enquanto outros – especialmente aqueles em condição de imunossupressão – podem apresentar restrições à vacinação, ou baixa taxa de soropositividade após receberem as primeiras doses da vacina contra o *SARS-CoV-2*⁸⁰. No caso de pacientes com câncer, não apenas a presença de tumores hematológicos e o uso de terapias anti-CD20, mas também transplantes de células-tronco hematopoiéticas e terapias com células CAR (*Chimeric Antigen Receptor*) podem tornar os indivíduos mais susceptíveis à COVID-19 grave, em parte devido à baixa produção de anticorpos decorrente dos regimes de condicionamento para alguns desses tratamentos^{47,49,80}. Portanto, fatores que possam indicar, de forma precoce, o maior risco de complicações respiratórias em decorrência da COVID-19, continuam sendo relevantes no contexto clínico.

Portanto, as duas características mais marcantes em comum entre pacientes oncológicos que faleceram em decorrência da COVID-19 são a concentração elevada de fatores imunes de fase aguda no plasma e diversas populações de linfócitos expressando marcadores associados à exaustão. Curiosamente, outro fator em comum entre os pacientes foi a ausência do aumento da concentração plasmática de citocinas como IL-12A e IFN- γ entre pacientes que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19 (**Figura 10**). Apesar da pergunta principal não ter sido a avaliação das diferentes apresentações clínicas da COVID-19 em pacientes com câncer, outros trabalhos com foco em parâmetros imunológicos também não apontaram diferenças nas concentrações dessas citocinas, mesmo quando pacientes foram comparados com indivíduos saudáveis^{53,54}. É possível que as baixas concentrações de IL-12A e IFN- γ tenham relação com os próprios tumores, visto que respostas “T_H1” são comumente associadas ao combate às células tumorais, e sua ausência, associada ao desenvolvimento do câncer^{3,13,81}. No entanto, como os mecanismos das respostas do tipo I se apresentam em pacientes oncológicos com COVID-19 ainda é uma questão em aberto.

Dando seguimento à interpretação dos dados, avaliamos as principais diferenças encontradas entre pacientes com tumores hematológicos e diferentes desfechos da COVID-19.

5.2 PERFIL DOS PACIENTES COM TUMORES HEMATOLÓGICOS E COVID-19

Entre pacientes com tumores hematológicos, detectamos que tanto idade quanto

presença de linfopenia foram associadas ao desfecho óbito (**Figura 8A e Tabela 2**), de forma semelhante ao observado na população geral^{50,66,82}. Além disso, pacientes com tumores hematológicos que faleceram apresentaram queda no hematócrito e na concentração de hemoglobina (**Figura 8B**). Em conjunto, esses resultados indicam a desregulação geral de células em circulação no sangue de pacientes que faleceram.

Alterações no perfil imune também foram marcantes nesta coorte. Enquanto indivíduos com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19 apresentaram, além do amplo perfil de exaustão linfocitária, frequências elevadas de células NK e células T duplo-positivas expressando o marcador CRTH2, pacientes que apresentaram frequências elevadas de células T CD161⁺ e células B ativadas e diferenciadas tiveram apenas a forma leve da COVID-19 (**Figura 11**).

Entre pacientes que faleceram, o aumento das células NK é um achado intrigante, visto sua importância para o desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos que se recuperaram. Entre pacientes com tumores hematológicos, a associação entre células NK e óbito pode ser decorrente da escassez de outros linfócitos. Desse modo, não teríamos um aumento real nos *números* de células NK nesses pacientes, mas um aumento na *frequência relativa* devido à baixa frequência de outras células, como monócitos e linfócitos T (**Figura 8A**). Curiosamente, outros trabalhos apontaram a queda na frequência de células NK entre pacientes com COVID-19 e câncer, embora a gravidade da COVID-19 não tenha sido avaliada^{27,53,83}. Independentemente da alteração real nos números de células NK, seria importante elucidar se sua atividade estava enviesada para a promoção de inflamação ao invés de atividade citolítica, o que também poderia influenciar o desfecho da doença⁵³. Apesar de termos encontrado concentrações elevadas de IL-15 no plasma de pacientes com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19 (**Figura 10**), infelizmente não conseguimos realizar uma caracterização detalhada do estado de ativação dessas células.

Outro achado importante entre pacientes que faleceram foi a frequência elevada de células T duplo-positivas que expressam o marcador CRTH2. Células duplo-positivas representam uma população bastante específica, geralmente associada às fases iniciais de maturação de linfócitos T, e que parecem não terem sido descritas no contexto da COVID-19⁸⁴. Já o marcador CRTH2 (também referido como DP2) é um receptor de prostaglandinas que está associado às respostas do tipo II e que foi investigado no contexto da COVID-19. Por exemplo, em estudos com pacientes, o bloqueio farmacológico desse receptor ou de outros receptores associados à resposta T_H2 foi capaz de melhorar os sintomas, indicando o potencial de células com o “perfil T_H2” de influenciar o desenvolvimento da COVID-19^{85–88}.

Já entre pacientes com tumores hematológicos que apresentaram COVID-19 leve, o achado intrigante foram as células T expressando o marcador CD161. Tal molécula é expressa por células T, células NK e células NKT, sendo associada tanto às células T invariantes de mucosa (MAIT), assim como a células com o perfil T_H17 ⁸⁹. Apesar de nossos painéis de citometria não permitirem uma caracterização aprofundada de nenhuma dessas subpopulações, dados da literatura apontam o aumento de células com perfil MAIT na circulação sanguínea de pacientes com COVID-19 leve, enquanto células com o perfil T_H17 são encontradas em frequência elevada no lavado broncoalveolar de pacientes com COVID-19 grave, sugerindo que a localização das células pode estar relacionada ao desfecho da doença^{32,90–92}.

Pacientes com tumores hematológicos que tiveram COVID-19 leve também apresentaram frequências elevadas de células B expressando os marcadores CXCR5 e CCR6 (**Figura 13**). Células B com esse perfil são capazes de produzir anticorpos e, possivelmente, tornarem-se células de memória^{93–95}. Além disso, a expressão de CCR6 em células B já foi sugerida como importante para a migração de populações de memória para tecidos de mucosa⁹⁶. Curiosamente, dados da literatura também apontam que a frequência de células B diminui entre pacientes oncológicos com COVID-19, muito embora a população $CXCR5^+CCR6^+$ não tenha sido avaliada^{40,53,54}. No presente trabalho observamos uma clara associação entre a presença de células B $CXCR5^+CCR6^+$, a produção de anticorpos específicos contra proteínas do *SARS-CoV-2*, e o desfecho de COVID-19 leve^{93–95}. Em oposição, pacientes com tumores hematológicos que faleceram apresentaram baixa presença de IgG e IgM anti-*SARS-CoV-2* no sangue (**Figura 11B, C**).

Interessantemente, existe forte correlação entre a carga viral de *SARS-CoV-2* encontrada na saliva de pacientes e a produção de anticorpos contra o vírus, sendo que pacientes com baixa produção de imunoglobulinas apresentaram os piores desfechos da COVID-19⁹⁷, o que vai ao encontro dos nossos achados. Além disso, embora a síntese de anticorpos anti-*SARS-CoV-2* varie bastante ao longo de duas semanas após o início dos sintomas da COVID-19⁹⁸, verificamos níveis de produção distintos entre pacientes com tumores hematológicos e com tumores sólidos que vieram a óbito, o que ajuda a reforçar a ideia de uma resposta humoral deficiente entre pacientes com tumores hematológicos (**Figura 11, dados não destacados**). A produção consistentemente baixa de IgG e IgM anti-*SARS-CoV-2* observada nesse estudo pode estar relacionada a alguns fatores, como: **i)** a falta de uma resposta eficiente dependente de células T^{34,99}; **ii)** o efeito de tratamentos antitumorais¹⁰⁰; **iii)** no contexto específico do mieloma múltiplo, pela produção de imunoglobulinas inespecíficas

que interferem na ação efetiva de anticorpos específicos¹⁰¹. Ainda assim, vale ressaltar que nas análises não-supervisionadas não foram observadas associações claras entre o tratamento antitumoral e o desfecho da doença, e que, apesar de todos os pacientes com tumores hematológicos que vieram a óbito apresentarem baixa produção de anticorpos, alguns pacientes nessa mesma condição tiveram apenas COVID-19 leve (**Figuras 15 e 16**).

Outro fator marcante associado ao desfecho da COVID-19 foi a síndrome de liberação de citocinas, amplamente referida como “tempestade de citocinas”^{56,102}. No presente trabalho, encontramos concentrações elevadas de diversos fatores imunes no plasma de pacientes com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19. Apesar de não termos encontrado diferenças na produção de IL-4 e IL-12A – citocinas associadas à polarização de linfócitos T –, indivíduos com tumores hematológicos que faleceram apresentaram indícios de aumento na produção de IL-17A (**Figura 9**). A IL-17A é uma citocina envolvida em respostas antifúngicas e contra determinadas bactérias extracelulares, e sua produção é alta em pacientes infectados com *SARS-CoV-2* e outros *SARS*¹⁰³, indicando a presença de uma resposta inadequada à eliminação viral. Por outro lado, as citocinas IL-5 e IL-13 – associadas às respostas do tipo II – foram encontradas em altas concentrações no plasma de pacientes com tumores hematológicos que faleceram. Tanto IL-5 quanto IL-13 estão associadas à ativação de eosinófilos e à doenças de vias aéreas como a asma e a hiperresponsividade brônquica^{73,103}. O papel dessas citocinas ainda não foi determinado durante o desenvolvimento da COVID-19, mas ambas estão associadas à gravidade da doença entre indivíduos da população geral⁵². Além disso, as concentrações desses fatores imunes solúveis parecem concordar com o achado de frequências mais elevadas de células duplo-positivas que expressam o marcador CRTH2, também associado às respostas T_H2, entre pacientes com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19.

Outras moléculas com concentrações elevadas no plasma de pacientes que faleceram foram CCL2, CCL3, CCL4, VEGFA e IL-1 β (**Figura 9**). CCL2, CCL3 e CCL4 são quimiocinas importantes para o recrutamento de monócitos, células dendríticas e macrófagos, enquanto a IL-1 β também está associada à indução de febre e inflamação¹⁰⁴. Já o fator de crescimento VEGFA é importante para o desenvolvimento e reestruturação de vasos sanguíneos, mas também é um indutor de inflamação, especialmente ao atuar como quimioatrativo e vasodilatador em sinergia com o FGF2¹⁰⁵. No contexto da COVID-19, o VEGFA ainda está associado à disseminação viral, hipóxia e dano tecidual³⁵. Em conjunto, os dados apontam que, entre pacientes com tumores hematológicos e COVID-19, um dos possíveis fatores envolvendo o desfecho óbito seja a síndrome de liberação de citocinas.

Seguindo essa linha de raciocínio, tanto a produção excessiva de citocinas quanto a deficiência na produção de anticorpos foram avaliadas em nossas análises de múltiplas correlações. Os padrões mais claros observados foram a produção integrada de anticorpos entre pacientes que apresentaram a forma leve da COVID-19, e a associação entre a produção de anticorpos e a presença de uma gama de diferentes fatores imunes solúveis relacionados a tipos distintos de respostas imunes. Ambos os padrões foram destacados e publicados em nosso primeiro manuscrito (**Apêndice 3**):

“Interessantemente, a análise das redes de interação de pacientes com tumores hematológicos que apresentaram apenas COVID-19 leve mostrou correlações extensas – porém leves – entre diversas citocinas associadas com as respostas imunes do tipo I, II e III. Observou-se o papel importante de citocinas como IL-15, IL-7 e anticorpos das classes IgA, IgG e IgM, sugerindo a ação de uma resposta do tipo I, importante para o combate do *SARS-CoV-2*^{35,106,31}. Também se observou um possível eixo de regulação para respostas do tipo II e III baseado na ação da Proteína C Reativa. Apesar de ser conhecida como um fator “pró-inflamatório”, a Proteína C Reativa também é capaz de induzir a produção de IL-1RN e IL-10, a regulação da produção de IL-12A e IFN- γ , a inibição de cascatas específicas do Complemento, e a redução do influxo de neutrófilos para os pulmões em modelos murinos de alveolite induzida¹⁰⁷. Uma vez que observamos vários casos de leucopenia entre pacientes com tumores hematológicos, é intrigante imaginar qual o papel da Proteína C Reativa durante as fases iniciais da infecção por *SARS-CoV-2*.

Já entre pacientes com tumores hematológicos cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito, observou-se um eixo de quimiocinas envolvendo CCL2, CCL3, CXCL8 e IL-6, além de uma correlação negativa entre a contagem de monócitos e a produção de IL-1 β . Isso pode indicar um mecanismo voltado para o recrutamento de células como forma de contrapor a leucopenia grave observada nesses pacientes. Também observamos correlações fortes envolvendo IL-2, TNF α e imunoglobulinas. Visto que a produção de anticorpos nesses pacientes foi baixa, é possível que a resposta imune tenha apresentado viés para a ação de células mielóides, o que poderia contribuir para os processos patológicos observados durante a COVID-19^{35,108}. Ainda nesse sentido, já foi documentado que concentrações elevadas de TNF α e IL-6 se correlacionam negativamente com o número de células T em pacientes da população geral com COVID-19³⁴, e que os números de células B e anticorpos *anti-RBD* e *anti-Spike* ficam reduzidos em pacientes onco-hematológicos com COVID-19⁵³. Esses resultados indicam que a falta de uma resposta do tipo I eficiente e a produção exacerbada de citocinas provavelmente são os fatores imunológicos mais importantes para o desenvolvimento de COVID-19 grave e morte entre pacientes com tumores hematológicos.” – Pignataro-Oshiro et. al, 2023¹⁰⁹.

Quando adicionamos a esses dados as análises de citometria de fluxo observamos, ainda, interações negativas entre a produção de anticorpos e a presença de células com marcadores associados à exaustão, tanto em pacientes do grupo COVID Leve, quanto aqueles do grupo COVID Grave + Óbito. Além disso, observamos um importante impacto de células de perfil regulatório entre pacientes que tiveram COVID-19 leve, visto as suas associações negativas com fatores imunes solúveis associados às respostas T_H2 e T_H17 , assim como com células de perfil exausto (**Figura 17B**). Nesse mesmo sentido, é interessante observar que células regulatórias positivas para o marcador CD95 (também denominado de Ligante de FAS) não apenas estavam aumentadas em circulação nos pacientes com COVID-19 leve, como ainda apresentaram diversas correlações negativas com várias células $PD-1^+$, incluindo células regulatórias encontradas em maior proporção entre pacientes que vieram a óbito (**Apêndice 1**). Por fim, ainda ficaram destacadas as correlações negativas entre células exaustas e diversos fatores imunes solúveis entre pacientes que faleceram em decorrência da COVID-19 (**Figura 17B**). Aqui vale lembrar que pacientes com tumores hematológicos que faleceram apresentaram queda expressiva em populações de linfócitos, reforçando que, mesmo em baixo número e com indícios de exaustão, essas células seriam importantes para desacelerar a ampla produção de fatores solúveis imunes observados no plasma desses pacientes (**Figura 17B**).

Os modelos de predição, por sua vez, apontaram a baixa produção de anticorpos e a alta produção de fatores imunes solúveis como os principais determinantes de desfecho da COVID-19, ao invés da possível exaustão celular. Os fatores com maior capacidade de predição do óbito entre pacientes com tumores hematológicos e COVID-19 foram exatamente as concentrações elevadas de quimiocinas associadas com o recrutamento de células mieloides, fatores associados à indução de inflamação, citocinas associadas com respostas do tipo II, e baixa produção de IgG e IgM *anti-SARS-CoV-2* (**Figura 19A**).

Sendo assim, um possível curso da COVID-19 entre pacientes com tumores hematológicos é descrito a seguir: Indivíduos com frequências elevadas de células CD161 seriam capazes de estruturar uma resposta suficientemente eficiente contra o *SARS-CoV-2*, conferindo tempo o suficiente para o estabelecimento de uma resposta humoral dependente de células T eficiente. Os mecanismos de produção de anticorpos, em conjunto com outros mecanismos não avaliados, seriam capazes de controlar a dispersão viral e evitar a ativação exacerbada da resposta imune, resultando em uma forma mais leve da doença. Por outro lado, pacientes com baixas frequências de linfócitos – talvez em especial aqueles positivos para o marcador CD161 – teriam maior dificuldade de estruturar uma resposta antiviral inicial

eficiente. A escassez de linfócitos não só aumentaria a pressão em outras células do sistema imunológico (como células NK e neutrófilos), como afetaria negativamente o estabelecimento da resposta humoral dependente de células T, resultando na baixa produção de anticorpos. O número limitado de células T também poderia exacerbar o potencial de células que normalmente possuem frequências muito baixas, como aquelas que expressam o marcador CCR2. Por fim, a ineficiência de mecanismos antivirais resultaria em maior dispersão viral, e consequentemente maior contato de diferentes tipos celulares com produtos virais, levando à produção de vários fatores imunes, especialmente aqueles voltados para o recrutamento de células imunes (como quimiocinas, IL-1 β e VEGFA). Além disso, fatores como IL-5, IL-13, e IL-17A poderiam contribuir para a ativação alternativa das defesas pulmonares. Esses mecanismos, associados à exaustão dos poucos linfócitos disponíveis, resultariam na forma mais grave da COVID-19, onde observa-se tanto o efeito direto do vírus quanto da desregulação da resposta imune. Nesses pacientes, a escassez celular parece induzir o quadro de síndrome de liberação de citocinas, que, por sua vez, contribuiria fortemente para o desfecho óbito.

Dando continuidade ao trabalho, abordamos os principais achados entre pacientes com tumores sólidos e COVID-19.

5.3 PERFIL DOS PACIENTES COM TUMORES SÓLIDOS E COVID-19

O primeiro fator de destaque entre pacientes com tumores sólidos e COVID-19 foi a ausência de associação entre idade e o desfecho clínico da infecção por *SARS-CoV-2*, muito embora idade e presença de múltiplas comorbidades sejam importantes fatores de risco entre pacientes com COVID-19⁵⁰. Acreditamos que a ausência de associação entre esses fatores e o óbito seja decorrente do número limitado de pacientes nas coortes deste estudo. Sendo assim, sugerimos parcimônia na interpretação dos dados epidemiológicos, especialmente levando-se em consideração que estudos realizados no próprio A.C. Camargo Cancer Center apontaram a idade como um importante fator de risco⁴⁷.

Outro achado importante foi a ausência de diferença nas contagens de leucócitos e linfócitos, ambos marcadores de gravidade da COVID-19 para a população geral^{66,82}. Apesar do achado, é importante destacar que mesmo pacientes com tumores sólidos sofrem redução de populações específicas de linfócitos T ao longo da COVID-19⁵³, de forma semelhante ao que ocorre na população geral²⁸. Sendo assim, é possível que a taxa de linfopenia entre pacientes com tumores sólidos não tenha sido tão elevada devido às coletas de sangue terem

sido realizadas ainda na fase inicial da doença, e não analisadas de forma longitudinal. Possivelmente, análises longitudinais trariam respostas mais concisas em relação à redução das frequências de linfócitos específicos ao longo do tempo, além de sua influência no desfecho da COVID-19.

Ainda assim, avaliações aprofundadas acerca do perfil imune de pacientes com tumores sólidos revelou padrões extremamente interessantes. Por exemplo, detectamos a presença de células T *naïve* entre indivíduos que apresentaram apenas a forma leve da COVID-19, uma ampla gama de células NK ativadas e células produtoras de IL-10 no grupo COVID Grave + Recuperação, a impressionante frequência elevada de células B, e células T expressando os marcadores CXCR5 e CCR6, entre pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito (**Figura 14**).

De forma geral, aparentemente uma das características mais marcantes para o desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos é o grau de eficiência da regulação imunológica. Não apenas células T regulatórias foram observadas em maior frequência no sangue de pacientes que não faleceram (**Figura 14B e C**), mas a análise de múltiplas correlações apontou uma marcante ruptura nos eixos de regulação entre pacientes que vieram a óbito (**Figura 18A**). Na análise primária, onde foram considerados todos os fatores solúveis avaliados com a plataforma *27-Plex*, publicamos os seguintes resultados (**Apêndice 3**):

“Em relação à análise de redes de interações, observou-se que pacientes com tumores sólidos que apresentaram apenas COVID-19 leve tiveram associações entre IL-6, IL-17A, IFN- γ e CCL3, enquanto a IL-1RN teve um possível papel de regulação. A citocina IL-1RN é observada em pacientes da população geral com COVID-19 grave⁵², e seu papel pode ser a regulação da ação da IL-1 β ¹⁰⁴, outra citocina associada à gravidade da doença. Interessantemente, não foram observadas associações entre IL-6, IL-12A ou IL-17A entre pacientes cujo desfecho da doença foi o óbito, enquanto a IL-4 correlacionou-se negativamente com a produção de IgM contra proteínas virais. Além disso, entre pacientes cujo desfecho da COVID-19 foi mais favorável, as correlações entre anticorpos foram muito mais intrincadas. Ainda, entre pacientes que se recuperaram da COVID-19 grave, observaram-se correlações entre as citocinas IL-10, IL-17A, e TNF α , um eixo de regulação perdido nos pacientes que vieram a óbito. Também observamos correlações positivas fortes entre dímeros-D, CXCL8, e contagem de monócitos em pacientes cujo desfecho da doença foi o óbito. Enquanto os dímeros-D estão associados com cascatas de coagulação e eventos trombóticos – características marcantes durante a COVID-19²⁸ – o aumento do recrutamento de neutrófilos em pacientes com tumores sólidos infectados por *SARS-CoV-2* já foi documentado⁵³. Já populações de monócitos e macrófagos também

foram apontadas como importantes determinantes de processos inflamatórios e de dano tecidual durante a COVID-19^{28,35-37}. Além disso, observou-se um eixo de interações positivas e negativas baseado na IL-15 entre pacientes que faleceram. Esse fato vai ao encontro do observado nas dosagens de analitos solúveis, onde as concentrações de IL-15 estavam mais elevadas em pacientes com COVID-19 grave. Mais uma vez, destaca-se a importância de avaliar se entre esses pacientes ocorrem processos de exaustão de células NK ou linfócitos, como demonstrado em outros estudos^{53,97,106}.” – Pignataro-Oshiro et al., 2023¹⁰⁹.

Quando incluímos os ensaios de citometria não observamos grandes diferenças nesses padrões. Verificamos que o desfecho óbito ou recuperação entre pacientes que apresentaram a forma grave da COVID-19 varia de acordo com as associações envolvendo células NK ativadas, células com perfil regulatório, e células exaustas, onde os eixos de regulação foram perdidos e as frequências de células T regulatórias estavam reduzidas exatamente nos pacientes que faleceram em decorrência da doença (**Figura 18A**).

Além da regulação imunológica, as células NK parecem ter influenciado a progressão e desfecho da COVID-19 nessa coorte. Entre pacientes que se recuperaram da COVID-19 grave, ficaram evidentes as características relacionadas à ativação e função citolítica de células NK. Além da presença de células produtoras de IFN- γ , Granzima B, e IL-10, amostras de plasma indicaram o aumento da concentração de IL-15 – uma importante citocina para a biologia das células NK¹¹⁰ (**Figura 14**).

Já entre pacientes que vieram a óbito, observamos além do amplo padrão de exaustão linfocitária, a presença de células com perfis intrigantes. Entre elas, o aumento da frequência de células B foi algo surpreendente, especialmente porque não encontramos diferenças na produção de anticorpos anti-*SARS-CoV-2* entre pacientes com tumores sólidos e diferentes apresentações clínicas da COVID-19. Além delas, ainda observamos células T expressando CXCR5 e CCR6, sendo o primeiro marcador associado às respostas humorais, e segundo associado às respostas T_H17.

Uma hipótese que poderia unificar os achados de células B, células T CXCR5⁺CCR6⁺, e produção inalterada de anticorpos anti-*SARS-CoV-2* é a resposta humoral anômala. De fato, alguns trabalhos apontaram o aumento da expressão de células B aberrantes e respostas extrafoliculares entre pacientes com COVID-19 grave e/ou que vieram a óbito^{111,112}. Por exemplo, embora o receptor CCR6 não tenha sido citado, o receptor CXCR5 já foi associado a diversas doenças autoimunes^{113,114}, inclusive nos locais de inflamação, como no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide¹¹⁵. Além disso, a presença de células T

CXCR5⁺CCR6⁺ circulantes já foi associada a doenças autoimunes relacionadas a anticorpos¹¹⁶, enquanto muitos trabalhos destacam o aumento da incidência de doenças autoimunes associadas à COVID-19^{65,117,118}. Ainda, diversos trabalhos demonstraram a associação entre respostas autoimunes, COVID-19 grave, e óbito¹¹⁹⁻¹²¹. Nesse sentido, é importante ressaltar que a presença de anticorpos específicos contra o vírus também se associa com a produção de autoanticorpos, especialmente entre pacientes com COVID-19 grave⁷². Portanto, é possível que a qualidade das respostas humorais tenha sido fortemente afetada nos pacientes que vieram a óbito, mesmo que a produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 tenha sido essencialmente igual entre os pacientes com diferentes desfechos da doença. Entretanto, se células T CXCR5⁺CCR6⁺ estão diretamente relacionadas ao aumento da incidência de doenças autoimunes, e se possuem papel direto na exacerbação da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos, é algo que precisaria ser investigado.

Uma hipótese diferente, no entanto, é que as células T CXCR5⁺CCR6⁺ apresentem um perfil de respostas do tipo III, visto que o receptor CCR6 já foi detalhadamente descrito em células com perfil TH17^{64,122}. Mesmo em células com perfil misto (regulatório/TH17), a presença do marcador CCR6 indica células com maior capacidade de promover inflamação associada à asma, resultando na produção de IL-4, IL-17A e CCL20¹²³. A importância do CCR6 entre células produtoras de IL-17A também foi observada em modelos de acidente vascular cerebral¹²⁴. Curiosamente, em ambos os trabalhos foram citadas a influência de citocinas como IL-6, CXCL8 e TNF α , além da ação de neutrófilos^{123,124}, fatores importantes para o desfecho óbito durante a COVID-19 de acordo com os dados do presente trabalho.

A importância do CCR6 no desfecho da COVID-19 fica ainda mais destacada quando consideramos a quimiocina CCL20, única capaz de se ligar a esse receptor. A CCL20 é produzida por neutrófilos, células endoteliais, células NK, células B, e células TH17, além de uma variedade de células mieloides, em tecidos como pulmões, linfonodos, e intestinos¹²⁵. Muito embora não tenhamos avaliado a expressão de CCL20 neste trabalho, alguns estudos apontaram a expressão de CCL20 ao nível de RNA e/ou proteína entre pacientes com COVID-19 grave, incluindo em amostras derivadas dos pulmões^{90,35,126}. Além das células T auxiliares foliculares (que expressam o receptor CXCR5) geralmente não expressam receptores de quimiocinas para tecidos não linfoides¹²⁷, a quimiocina CXCL13, único ligante conhecido do receptor CXCR5, não foi observada nesses mesmos trabalhos. Portanto, é possível que células T CXCR5⁺CCR6⁺ estejam relacionadas à piora clínica por exacerbar as respostas de perfil TH17. Entretanto, apesar de encontramos células capazes de produzir IL-17A *in vitro*, não vimos alterações nas concentrações plasmáticas da citocina entre pacientes

que vieram a óbito (**Figuras 14A e 9C**).

Adicionando à complexidade do achado, vale ressaltar que uma população de linfócitos denominados “células T auxiliares periféricas” (em contraste às células T auxiliares foliculares) já foi descrita. Essas células apresentam baixa expressão de CXCR5 e alta produção de IL-21, estando fortemente associadas a processos autoimunes¹²⁷. A IL-21, por sua vez, também foi identificada em amostras pulmonares de pacientes com COVID-19^{90,128}, e sua produção foi associada a uma subpopulação de células T_H17⁹⁰. Sendo assim, há evidências de que ambos os mecanismos – sejam os associados à autoimunidade ou os associados à resposta do tipo III – tenham influenciado o desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos.

Os mecanismos exatos que permeiam a resposta imune contra o *SARS-CoV-2* em pacientes com tumores sólidos não foram completamente descritos durante nossas investigações, mas um possível curso da doença seria o seguinte: Alguns indivíduos conseguiriam controlar a dispersão viral em sua fase inicial, sendo ainda capazes de regular a resposta imune de forma eficiente. Assim, teríamos uma ativação de menor amplitude entre as células T, o que explicaria a frequência elevada de células T TCR $\gamma\delta^+$ *naïve* em circulação. Ademais, a presença de células T regulatórias de memória central – talvez até em decorrência de exposições anteriores a outros coronavírus – contribuiria para a modulação da resposta imune.

Outros indivíduos, por sua vez, teriam uma ampla ativação de células da imunidade inata, em especial células NK, mas também de linfócitos específicos capazes de produzir citocinas. A ativação de células NK seria induzida por e contribuiria para a produção elevada de IL-15 – observada em alta concentração no plasma desses pacientes –, mas seria controlada tanto pela presença de células capazes de produzir IL-10, quanto por células T regulatórias. Assim, apesar de um perfil de ativação imune mais amplo – possivelmente devido a uma maior dispersão viral – esses pacientes conseguiriam controlar a resposta imune e prevenir danos oriundos do vírus e de células imunes.

Por outro lado, alguns indivíduos apresentariam níveis elevados de IL-6 e CXCL8 no plasma, indicando a possível ativação de células mieloides. Esse quadro de ativação se estenderia às células T, onde observa-se o aumento da expressão de marcadores associados à proliferação, ativação, e exaustão celular, além da capacidade de produção de citocinas associadas a diferentes respostas imunes. A ativação generalizada de células imunes, combinada com a ausência de mecanismos de regulação eficientes, levaria a um quadro de desregulação imune. Não se sabe até que ponto a desregulação afetaria as células B, mas é

possível que essas células estejam promovendo respostas autoimunes, assim como as células T CXCR5⁺CCR6⁺, que ainda poderiam exacerbar mecanismos relacionados às respostas do tipo III. Nesses pacientes, o impacto da desregulação das células imunes – e não a síndrome de liberação de citocinas – parece ser o componente mais importante para o desfecho óbito.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados deste trabalho apontam que pacientes com tumores hematológicos e com tumores sólidos respondem de forma distinta à infecção por *SARS-CoV-2*, sugerindo que os mecanismos que levam à progressão da doença e ao óbito também são diferentes (**Figura 20**).

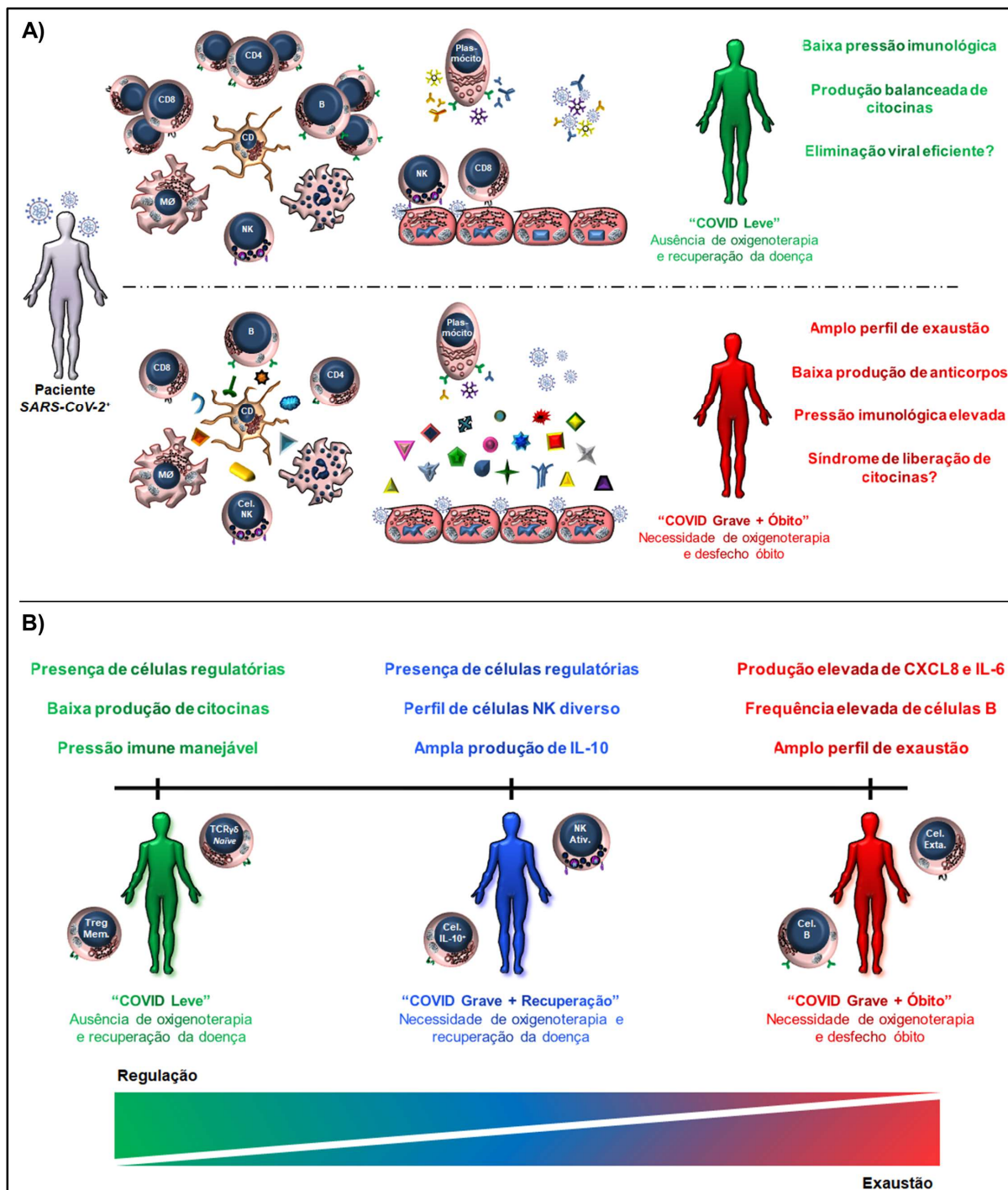


Figura 20 – Os desfechos morte e recuperação estão associados a diferentes perfis imunes entre pacientes oncológicos. Pacientes com tumores hematológicos apresentaram dois principais cursos da COVID-19: Indivíduos que apresentavam porcentagens mais elevadas de células T e células B ativadas, assim como maior

produção de anticorpos anti-*SARS-CoV-2* e um perfil de fatores imunes solúveis equilibrado no momento do diagnóstico da COVID-19 tiveram apenas a forma leve da doença. Por outro lado, pacientes que, próximo ao dia do diagnóstico de infecção por *SARS-CoV-2*, apresentaram concentrações elevadas de fatores imunes solúveis no plasma, presença elevada de células T Duplo-Positivas CRTH2⁺, células NK, e um amplo perfil de exaustão linfocitária, tiveram a forma mais grave da COVID-19 e vieram a óbito em decorrência da doença **(A)**. Pacientes com tumores sólidos poderiam ser caracterizados, de forma geral, entre aqueles que apresentaram boa capacidade de regulação das respostas imunes, nos quais o desfecho da COVID-19 foi a recuperação, e aqueles cuja desregulação imune levou a um quadro grave de exaustão celular, culminando no desfecho óbito. Nesses pacientes, enquanto a frequência de células regulatórias reduz, a expressão de fatores imunes de recrutamento celular (CXCL8 e IL-6) e células com perfil exausto aumenta de acordo com a gravidade da COVID-19. Ainda, são observadas evidências de respostas aberrantes de células B, que precisariam ser melhor investigadas **(B)**.

Fonte: Autoria própria.

De forma generalizada, pacientes oncológicos demonstraram dois perfis imunes circulantes distintos dias após a confirmação da infecção por *SARS-CoV-2*, apesar de observarmos algumas semelhanças importantes. Enquanto o perfil de exaustão de linfócitos foi encontrado em ambos os grupos de pacientes oncológicos, especialmente aqueles cujo desfecho da COVID-19 foi o óbito, a atuação de outras variáveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, anticorpos, e populações celulares específicas, apresentaram papéis importantes de acordo com o tipo de câncer (sólido ou hematológico) e a gravidade da COVID-19.

Por exemplo, fatores imunes circulantes de forma geral pareceram exercer influência muito maior entre pacientes com tumores hematológicos, onde tanto a alta produção de anticorpos, quanto a alta produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram importantes para a definição do desfecho da COVID-19. Esses mesmos fatores, por sua vez, não pareceram ter tanta influência no desfecho da COVID-19 entre pacientes com tumores sólidos, onde observamos apenas o possível impacto das citocinas IL-6, CXCL8 e IL-15. De forma semelhante, células B também pareceram exercer papéis diferentes, onde subpopulações específicas de células B ativadas e diferenciadas foram associadas à COVID-19 leve entre pacientes com tumores hematológicos. Por outro lado, a presença de células B no geral e células T positivas para os marcadores CXCR5 e CCR6 foi associada ao desfecho óbito entre pacientes com tumores sólidos. No mesmo sentido, células NK apresentaram perfis distintos de atuação entre os dois grupos, onde subpopulações específicas foram observadas nos pacientes com tumores sólidos que se recuperaram da COVID-19 grave, enquanto a alta frequência de células NK no geral foi associada ao óbito entre pacientes com tumores hematológicos, possivelmente em decorrência da falta de outras populações de

linfócitos. Esses achados são importantes por destacar a COVID-19 como uma doença de grande complexidade, onde características específicas dos indivíduos contribuem fortemente para a apresentação clínica da doença.

Ainda assim, é importante destacar algumas das limitações relativas ao projeto. Avaliamos a resposta imune de pacientes oncológicos num contexto muito específico da COVID-19, onde as variantes do *SARS-CoV-2* eram diferentes das que estão em circulação hoje, e numa época onde vacinas contra o vírus ainda não estavam disponíveis. Além disso, trabalhamos com coortes relativamente pequenas, pouco heterogêneas em termos de fatores demográficos, e muito heterogêneas no que diz respeito ao tipo de câncer, características específicas de cada indivíduo, e tipo de tratamento empregado. Reconhecemos, porém, que essas condições também são observados em outros estudos acerca da resposta imune de pacientes oncológicos frente à infecção pelo *SARS-CoV-2*. Além disso, apesar de detectarmos analitos que indicam inflamação baseada em células mieloides durante as fases iniciais da COVID-19, não fomos capazes de investigar essas populações com os painéis de citometria disponíveis, visto a escassez de células nas amostras de grande parte dos pacientes. Ainda assim, análises de amostras das vias aéreas indicam aumento nas populações de macrófagos não-residentes e de neutrófilos em pacientes da população geral com COVID-19 crítica³⁵⁻³⁷, o que deveria ser analisado de forma mais profunda entre pacientes oncológicos. Nesse mesmo sentido, uma vez que a CXCL8 foi um importante fator preditivo para o desfecho da COVID-19 entre pacientes oncológicos, é interessante avaliar se tal resultado seria encontrado em coortes de validação.

Apesar dos desafios, fomos capazes de, até certo ponto, contornar dificuldades ao aplicar técnicas avançadas de caracterização de perfis imunes e estratégias robustas de análise de dados. A partir dessas avaliações encontramos padrões bastante destacados, e que são suportados pela literatura científica disponível. Assim, nosso estudo ajuda a agregar conhecimento acerca da resposta imune de pacientes oncológicos frente à infecções por coronavírus. Não apenas adicionamos evidências de que pacientes com tumores sólidos e tumores hematológicos respondem de forma distinta, mas também de que o sistema imune pode exercer forte influência no desfecho da COVID-19 entre esses pacientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Filho GB. Bogliolo Patologia. 8ª Ed. Filho GB, editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. 219-275 p.
2. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Patologia Básica. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Sauders; 2013. 161-214 p.
3. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell [Internet]. 2010;140(6):883–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
5. Institute NC. Solid Tumor [Internet]. NCI Dictionaries. 2022 [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/solid-tumor>
6. Institute NC. Hematologic Cancer [Internet]. NCI Dictionaries. 2022 [cited 2022 Jan 24]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hematologic-cancer>
7. Olsen M. Overview of hematologic malignancies. Clin Adv Hematol Oncol. 2008;6(9 SUPPL. 17):4–6.
8. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. Oncogene. 2004;23(43 REV. ISS. 6):7274–82.
9. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology. 2007;121(1):1–14.
10. Paul D. The systemic hallmarks of cancer. J Cancer Metastasis Treat. 2020;2020.
11. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. Nat Rev Cancer. 2020;20(5):285–98.
12. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. Physiology. 2010;25(2):85–101.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. 8ª Edição. Rio de

- Janeiro: Elsevier Inc.; 2015.
14. Komastu T, Ireland DDC, Reiss CS. IL-12 and Viral Infections. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3/4):277–85.
 15. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol.* 2018;9(SEP):1–10.
 16. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: Therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol.* 2018;11(1):21–34.
 17. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):403–11.
 18. Gao R, Bhatnagar J, Blau DM, Greer P, Rollin DC, Denison AM, et al. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): Role of the host immune response in pathogenesis. *Am J Pathol.* 2013;183(4):1258–68.
 19. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):141–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
 20. Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan , China : a modelling study. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10225):689–97. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9)
 21. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, Adhikari N, Angus DC, Arabi YM, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(8):e192–7.
 22. Souza WM De, Buss LF, Candido S, Carrera J paul, Li S, Zarebski AE, et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nat Hum Behav* [Internet]. 2020;4(August). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41562-020-0928-4>
 23. Zeiser FA, Donida B, da Costa CA, Ramos G de O, Scherer JN, Barcellos NT, et al. First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. *Lancet Reg Heal - Am.* 2022;6(November 2021).

24. Brazilian Ministry of Health D. Painei Coronavírus [Internet]. 2022 [cited 2022 Oct 31]. Available from: <https://covid.saude.gov.br/>
25. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, et al. Coronavirus Disease 2019 - COVID19. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(4):1–48.
26. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: How does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 2008;123(3):326–38.
27. Butcher MJ, Zhu J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev*. 2021;10(30).
28. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(6):355–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
29. Hasan A, Al-Ozairi E, Al-Baqsumi Z, Ahmad R, Al-Mulla F. Cellular and humoral immune responses in covid-19 and immunotherapeutic approaches. *ImmunoTargets Ther*. 2021;10:63–85.
30. Purbey PK, Roy K, Gupta S, Paul MK. Mechanistic insight into the protective and pathogenic immune-responses against SARS-CoV-2. *Mol Immunol* [Internet]. 2023;156(February):111–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.03.009>
31. Meffre E, Iwasaki A. Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature*. 2020;587(7834):374–6.
32. Flament H, Rouland M, Beaudoin L, Toubal A, Bertrand L, Lebourgeois S, et al. Outcome of SARS-CoV-2 infection is linked to MAIT cell activation and cytotoxicity. *Nat Immunol* [Internet]. 2021;22(3):322–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-021-00870-z>
33. De Biasi S, Meschiari M, Gibellini L, Bellinazzi C, Borella R, Fidanza L, et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat Commun*. 2020;11(1):1–17.
34. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:1–14.

35. Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol.* 2020;
36. Bost P, Giladi A, Liu Y, Bendjelal Y, Xu G, David E, et al. Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients. *Cell* [Internet]. 2020;181(7):1475–1488.e12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.006>
37. Grant RA, Morales-Nebreda L, Markov NS, Swaminathan S, Querrey M, Guzman ER, et al. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature.* 2021;
38. Kong Y, Wang Y, Wu X, Han J, Li G, Hua M, et al. Storm of soluble immune checkpoints associated with disease severity of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):4–6.
39. Tan J, Li Y. Immune checkpoint alterations and their blockade in COVID-19 patients. *Blood Sci.* 2022;4(4):192–8.
40. Chvatal-Medina M, Mendez-Cortina Y, Patiño PJ, Velilla PA, Rugeles MT. Antibody Responses in COVID-19: A Review. *Front Immunol.* 2021;12(April):1–14.
41. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2022;23(7):1008–20.
42. Lee LYW, Cazier JB, Starkey T, Briggs SEW, Arnold R, Bisht V, et al. COVID-19 prevalence and mortality in patients with cancer and the effect of primary tumour subtype and patient demographics: a prospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2020;21(10):1309–16.
43. Derosa L, Melenotte C, Griscelli F, Gachot B, Marabelle A, Kroemer G, et al. The immuno-oncological challenge of COVID-19. *Nat Cancer* [Internet]. 2020;1(October). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-00122-3>
44. Zhang L, Zhu F, Xie L, Wang C, Wang J, Chen R, et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. *Ann Oncol.* 2020;31(7):894–901.
45. Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. 2020;21(3):335–7.
46. Robilotti E V, Babady NE, Mead PA, Rolling T, Perez-Johnston R, Bernardes M, et al.

- Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nat Med* [Internet]. 2020; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32581323>
47. Fernandes GA, Feriani D, França e Silva ILA, Mendonça e Silva DR, Arantes PE, Canteras J da S, et al. Differences in mortality of cancer patients with COVID-19 in a Brazilian cancer center. *Semin Oncol* [Internet]. 2021;48(2):171–80. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2021.01.003>
 48. Esperança-Martins M, Gonçalves L, Soares-Pinho I, Gomes A, Serrano M, Blankenhaus B, et al. Humoral Immune Response of SARS-CoV-2–Infected Patients with Cancer: Influencing Factors and Mechanisms. *Oncologist* [Internet]. 2021 Sep 1;26(9):e1619–32. Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/article/26/9/e1619/6512108>
 49. Thakkar A, Gonzalez-Lugo JD, Goradia N, Gali R, Shapiro LC, Pradhan K, et al. Seroconversion rates following COVID-19 vaccination among patients with cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2021;39(8):1081–1090.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.06.002>
 50. Russell CD, Lone NI, Baillie JK. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. *Nat Med*. 2023;29(2):334–43.
 51. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy for Relapsed Indolent Lymphoma: Half of Patients Respond to a Four-Dose Treatment Program. *J Clin Oncol*. 2023;41(2):154–62.
 52. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463–9.
 53. Abdul-Jawad S, Baù L, Alaguthurai T, del Molino del Barrio I, Laing AG, Hayday TS, et al. Acute Immune Signatures and Their Legacies in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 Infected Cancer Patients. *Cancer Cell*. 2021;39(2):257–275.e6.
 54. Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med* [Internet]. 2021;27(7):1280–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-021-01386-7>

55. Sacconi A, De Vitis C, de Latouliere L, di Martino S, De Nicola F, Goeman F, et al. Multi-omic approach identifies a transcriptional network coupling innate immune response to proliferation in the blood of COVID-19 cancer patients. *Cell Death Dis.* 2021;12(11).
56. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10229):1033–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
57. Indini A, Rijavec E, Ghidini M, Bareggi C, Cattaneo M, Galassi B, et al. Coronavirus infection and immune system: An insight of COVID-19 in cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2020 Sep;153(January):103059. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842820301955>
58. Chamilos G, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Are All Patients with Cancer at Heightened Risk for Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)? *Clin Infect Dis.* 2020;72(2):351–6.
59. Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med* [Internet]. 2021;27(1):28–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-01202-8>
60. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693–704.
61. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W566–70.
62. MetaboAnalyst. Available from: <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>
63. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinforma.* 2019;68(1):1–128.
64. Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2009;2(2):173–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2008.84>
65. Ioannidou K, Ndiaye DR, Noto A, Fenwick C, Fortis SP, Pantaleo G, et al. In Situ

- Characterization of Follicular Helper CD4 T Cells Using Multiplexed Imaging. *Front Immunol.* 2021;11(February):1–16.
66. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastiris E, Sargentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol.* 2020;95(7):834–47.
 67. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde: 2019 - Percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões [Internet]. IBGE - Coordenação de Trabalho e Rendimento/Ministério da Saúde. 2020. 113 p. Available from: <http://www.pns.iciet.fiocruz.br/arquivos/Portaria.pdf>
 68. Saúde M da. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças nas capitais dos 26 Estados Brasileiros e no Distrito Federal em 2020 [Internet]. 2021. Available from: www.saude.gov.br/svs
 69. Wang Y, Zheng J, Islam MS, Yang Y, Hu Y, Chen X. The role of cd4+foxp3+ regulatory t cells in the immunopathogenesis of covid-19: Implications for treatment. *Int J Biol Sci.* 2021;17(6):1507–20.
 70. Wang H, Wang Z, Cao W, Wu Q, Yuan Y, Zhang X. Regulatory T cells in COVID-19. *Aging Dis.* 2021;12(7):1545–53.
 71. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OMZ. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):859–69.
 72. Prado C, Gómez J, López P, de Paz B, Gutiérrez C, Suárez A. Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology* [Internet]. 2011;216(3):386–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2010.06.013>
 73. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics.* 2017;7(6):1543–88.
 74. McKenna E, Wubben R, Isaza-Correa JM, Melo AM, Mhaonaigh AU, Conlon N, et al. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. *Front Immunol.* 2022;13(June):1–12.
 75. Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The

- relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.* 2020;2020.
76. Reusch N, De Domenico E, Bonaguro L, Schulte-Schrepping J, Baßler K, Schultze JL, et al. Neutrophils in COVID-19. *Front Immunol.* 2021;12(March):1–9.
 77. NCT04347226. Anti-Interleukin-8 (Anti-IL-8) for Cancer Patients With COVID-19. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04347226> [Internet]. 2020; Available from: <https://www.cochranelibrary.com/central/doi/10.1002/central/CN-02091672/full>
 78. Kong Y, Han J, Wu X, Zeng H, Liu J, Zhang H. VEGF-D: A novel biomarker for detection of COVID-19 progression. *Crit Care.* 2020;24(1):1–4.
 79. Chen L, Wang G, Tan J, Cao Y, Long X, Luo H, et al. Scoring cytokine storm by the levels of MCP-3 and IL-8 accurately distinguished COVID-19 patients with high mortality. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):8–10.
 80. Hall VG, Teh BW. COVID-19 Vaccination in Patients With Cancer and Patients Receiving HSCT or CAR-T Therapy: Immune Response, Real-World Effectiveness, and Implications for the Future. *J Infect Dis* [Internet]. 2023;228:S55–69. Available from: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad174>
 81. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(8):721–8.
 82. Pereira MAM, de Almeida Barros IC, Jacob ALV, de Assis ML, Kanaan S, Kang HC. Laboratory findings in SARS-CoV-2 infections: State of the art. *Rev Assoc Med Bras.* 2020;66(8):1152–6.
 83. Bergantini L, D’alessandro M, Cameli P, Cavallaro D, Gangi S, Cekorja B, et al. Nk and t cell immunological signatures in hospitalized patients with covid-19. *Cells.* 2021;10(11).
 84. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4 + /CD8 + double-positive T cells: more than just a developmental stage? . *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):31–8.
 85. Gupta A, K KZ, TR S. Ramatroban as a Novel Immunotherapy for COVID-19. *Mol Genet Med.* 2020;14(3).
 86. Gupta A, Chander Chiang K. Prostaglandin D2 as a mediator of lymphopenia and a therapeutic target in COVID-19 disease. *Med Hypotheses.* 2020;143(June):2–4.
 87. Ogletree ML, Chander Chiang K, Kulshrestha R, Agarwal A, Agarwal A, Gupta A.

- Treatment of COVID-19 Pneumonia and Acute Respiratory Distress With Ramatroban, a Thromboxane A2 and Prostaglandin D2 Receptor Antagonist: A Four-Patient Case Series Report. *Front Pharmacol.* 2022;13(July):1–8.
88. Baker JR, Mahdi M, Nicolau D V., Ramakrishnan S, Barnes PJ, Simpson JL, et al. Early Th2 inflammation in the upper respiratory mucosa as a predictor of severe COVID-19 and modulation by early treatment with inhaled corticosteroids: a mechanistic analysis. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2022;10(6):545–56. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00002-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00002-9)
 89. Fergusson JR, Fleming VM, Klenerman P. CD161-expressing human T cells. *Front Immunol.* 2011;2(AUG):1–7.
 90. Zhao Y, Kilian C, Turner JE, Bosurgi L, Roedl K, Bartsch P, et al. Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients. *Sci Immunol.* 2021;6(16):1–18.
 91. Fergusson JR, Smith KE, Fleming VM, Rajoriya N, Newell EW, Simmons R, et al. CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Rep.* 2014;9(3):1075–88.
 92. Karunathilaka A, Halstrom S, Price P, Holt M, Lutzky VP, Doolan DL, et al. CD161 expression defines new human $\gamma\delta$ T cell subsets. *Immun Ageing.* 2022;19(1):1–8.
 93. Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood.* 1994;84(3):830–40.
 94. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell.* 1996;87(6):1037–47.
 95. Suan D, Kräutler NJ, Maag JLV, Butt D, Bourne K, Hermes JR, et al. CCR6 Defines Memory B Cell Precursors in Mouse and Human Germinal Centers, Revealing Light-Zone Location and Predominant Low Antigen Affinity. *Immunity.* 2017;47(6):1142–1153.e4.
 96. Krzysiek R, Lefevre EA, Bernard J, Foussat A, Galanaud P, Louache F, et al. Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 in human B cells. *Blood.* 2000;96(7):2338–45.

97. Silva J, Lucas C, Sundaram M, Israelow B, Wong P, Klein J, et al. Saliva viral load is a dynamic unifying correlate of COVID-19 severity and mortality. medRxiv. 2021;
98. Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol*. 2021;5(54):1–20.
99. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell* [Internet]. 2020;181(7):1489–1501.e15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
100. Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* [Internet]. 2016;7(8):901–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2016.1208866>
101. Jackson DA, ElSawa SF. Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. *Biomolecules*. 2015;5(1):20–40.
102. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2255–73.
103. Schett G, Manger B, Simon D, Caporali R. COVID-19 revisiting inflammatory pathways of arthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2020; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41584-020-0451-z>
104. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8–27.
105. Presta M, Andrés G, Leali D, Dell’Era P, Ronca R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. *Eur Cytokine Netw*. 2009;20(2):39–50.
106. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Aug 7;369(6504):718–24. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc6027>
107. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(47):48487–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R400025200>
108. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2017;39(5):529–39.

109. Pignataro-Oshiro F, Figueiredo AB, Galdino NAL, Morais KLP, Dutra WO, Silva BG de M, et al. Distinct systemic immune networks define severe vs. mild COVID-19 in hematologic and solid cancer patients. *Front Immunol.* 2023;13(January):1–19.
110. Carson BWE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 Is a Novel Cytokine That Activates Human Natural Killer Cells via Components of the IL-2 Receptor. *October.* 1994;180(October).
111. Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):143–157.e13.
112. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol [Internet].* 2020;21(12):1506–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-00814-z>
113. Hinrichs AC, Kruize AA, Leavis HL, van Roon JAG. In patients with primary Sjögren's syndrome innate-like MAIT cells display upregulated IL-7R, IFN- γ , and IL-21 expression and have increased proportions of CCR9 and CXCR5-expressing cells. *Front Immunol.* 2022;13(November):1–10.
114. Ekman I, Ihantola EL, Viisanen T, Rao DA, Nääntö-Salonen K, Knip M, et al. Circulating CXCR5–PD-1hi peripheral T helper cells are associated with progression to type 1 diabetes. *Diabetologia [Internet].* 2019 Sep 3;62(9):1681–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-019-4936-8>
115. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature.* 2017;542(7639):110–4.
116. Li X yi, Wu Z biao, Ding J, Zheng Z hui, Li X yan, Chen L na, et al. Role of the frequency of blood CD4 + CXCR5 + CCR6 + T cells in autoimmunity in patients with Sjögren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422(2):238–44.
117. Gracia-Ramos AE, Martin-Nares E, Hernández-Molina G. New onset of autoimmune diseases following covid-19 diagnosis. *Cells.* 2021;10(12):1–19.
118. Chang R, Yen-Ting Chen T, Wang SI, Hung YM, Chen HY, Wei CCJ. Risk of autoimmune diseases in patients with COVID-19: A retrospective cohort study.

- eClinicalMedicine [Internet]. 2023;56(1000):101783. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101783>
119. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* (80-). 2020;370(6515).
 120. Chang SE, Feng A, Meng W, Apostolidis SA, Mack E, Artandi M, et al. New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-25509-3>
 121. Wang EY, Mao T, Klein J, Dai Y, Huck JD, Jaycox JR, et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature*. 2021;595(7866):283–8.
 122. Gómez-Melero S, García-Maceira FI, García-Maceira T, Luna-Guerrero V, Montero-Peñalvo G, Túnez-Fiñana I, et al. Amino terminal recognition by a CCR6 chemokine receptor antibody blocks CCL20 signaling and IL-17 expression via β -arrestin. *BMC Biotechnol*. 2021;21(1):1–15.
 123. Shen X, Zhang H, Xie H, Chen L, Li S, Zheng J, et al. Reduced CCR6+IL-17A+Treg Cells in Blood and CCR6-Dependent Accumulation of IL-17A+Treg Cells in Lungs of Patients With Allergic Asthma. *Front Immunol*. 2021;12(August):1–12.
 124. Arunachalam P, Ludewig P, Melich P, Arumugam TV, Gerloff C, Prinz I, et al. CCR6 (CC Chemokine Receptor 6) Is Essential for the Migration of Detrimental Natural Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells in Stroke. *Stroke*. 2017;48(7):1957–65.
 125. Lee AYS, Eri R, Lyons AB, Grimm MC, Korner H. CC chemokine ligand 20 and its cognate receptor CCR6 in mucosal T cell immunology and inflammatory bowel disease: Odd couple or axis of evil? *Front Immunol*. 2013;4(JUL):1–7.
 126. Ren X, Wen W, Fan X, Hou W, Su B, Cai P, et al. COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. *Cell*. 2021;184(7):1895–1913.e19.
 127. Rao DA. T cells that help B cells in chronically inflamed tissues. *Front Immunol*. 2018;9(August).
 128. Kreutmair S, Unger S, Núñez NG, Ingelfinger F, Alberti C, De Feo D, et al. Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. *Immunity*. 2021;54(7):1578–1593.e5.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Determinação de fatores de risco associados a resposta imune, microbioma/viroma e metabolômica na evolução da infecção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19.

Pesquisador: MARJORIE VIEIRA BATISTA

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 6

CAAE: 30283220.5.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.972.137

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1704696_E1.pdf, de 11/06/2021) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto_Coronavirus_E1.pdf).

RESUMO

Desde o início de dezembro de 2019, um surto por um novo vírus identificado como SARS-CoV-2 iniciou-se em Wuhan, província de Hubei, China. Diante deste avanço alarmante para diversos países além da China, em 11 de março de 2020 a Organização Mundial de Saúde decretou que a doença causada pelo SARS-CoV-2 (COVID-19) é uma pandemia. O comportamento da infecção em pacientes imunodeprimidos ainda foi pouco estudado. Entretanto, a exemplo dos demais vírus respiratórios que acometem essa população, a infecção pode causar complicações graves como, infecções do trato respiratório inferior (ITRI), bronquiolite obliterante (BO) e até o óbito. Objetivos: Determinação de fatores de risco, resposta imune e microbioma, identificação de proteínas e metabólitos na evolução da infecção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes receptores de transplante de células hematopoiéticas, com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos e

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

identificação de variantes genéticas de susceptibilidade a manifestação de sintomas graves nesta população. Materiais e métodos: O presente estudo é observacional do tipo coorte prospectiva com enfoque nas infecções pelo SARS-CoV-2 nos receptores de TCH, neoplasias hematológicas e pacientes com tumores sólidos. Todos esses pacientes devem receber atendimento no A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC), São Paulo, Brasil. Conclusão: A determinação em conjunto da interação entre preditores clínicos, composição e dinâmica temporal da microbiota nasal e intestinal, a resposta imune celular do hospedeiro e identificação de metabólitos, e identificação de variantes genéticas para manifestação de sintomas mais graves nesta população pode contribuir para o entendimento dos fatores de risco que levam a progressão para infecções graves e óbito entre pacientes oncológicos diagnosticados com a COVID-19. Adicionalmente, no futuro próximo, poderão consubstanciar estratégias de manejo da infecção pelo SARS-CoV-2 ao identificar os pacientes de maior risco para desenvolverem os quadros mais graves da doença.

HIPÓTESE

Esperamos que os resultados do trabalho proposto levem a avanços importantes na implementação da medicina personalizada para o tratamento de doenças infecciosas nesta população de alto risco. A aplicação da tecnologia Next Generation Sequencing (NGS), estudos de associação genômica ampla conhecida como GWAS (do inglês Genome-Wide Association Studies), perfis imunes e identificação de metabólitos, no campo das doenças infecciosas, nos permitirá avaliar os fatores de risco de um paciente para pior prognóstico e adaptar biomarcadores preditivos individuais, ferramentas de diagnóstico e tratamentos preventivos (49-51). Nossas descobertas também contribuirão para uma compreensão mais ampla da complexa interação entre fatores imunes do hospedeiro e os virais, na fisiopatologia da COVID-19. Adicionalmente, determinar a interação entre preditores clínicos, a composição e dinâmica temporal da microbiota nasal, intestinal e a resposta imune celular do hospedeiro que, em conjunto, podem contribuir para a progressão para infecções graves e óbito, entre pacientes oncológicos. Os possíveis resultados deste estudo poderão, no futuro próximo, consubstanciar estratégias de manejo da infecção pelo SARS-CoV-2 (e talvez outros surtos de infecções virais) ao identificar os pacientes de maior risco para desenvolverem os quadros mais graves da doença, além de apontar moléculas, vias de sinalização, ou células-alvo para o desenvolvimento de novas terapias e vacinas.

METODOLOGIA

4. MATERIAL E MÉTODOS: O presente estudo é observacional do tipo coorte prospectiva com

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

enfoque nas infecções pelo SARS-CoV-2 nos receptores de TCH, neoplasias hematológicas ou pacientes com tumores sólidos. Todos esses pacientes devem receber atendimento no A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC), São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos de coleta de dados e métodos laboratoriais serão seguidos de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética desta instituição. 4.1. Coorte dos pacientes: Durante o período de epidemia do SARS-CoV-2 de 2020, serão incluídos 100 pacientes do ACCCC, diagnosticados com diferentes neoplasias e estadiamentos. Seguiremos cada paciente até 12 meses após sua entrada no estudo e coletaremos amostras respiratórias, fecais e sanguíneas em até 3 momentos no decorrer do estudo:

- tempo 1: ao diagnóstico;
- tempo 2: na progressão para ITRI (se ocorrer);
- tempo 3: no retorno no ambulatório em uma semana da infecção. Para pacientes que evoluam para SARS (infiltrado bilateral e relação Pao2/FiO2 300) Serão coletados nestes momentos: 1 tubo de sangue, 4 swabs nasais (dois para estudos moleculares e dois para estudos imunológicos) e 1 amostra de fezes. Cabe notar que adotamos o uso de swab nasal por este ser o método que revelou maior carga viral em recente estudo realizado com mais de 1000 amostras obtidas de 205 pacientes hospitalizados em Wuhan, China [26].

4.4. Extração de ácidos nucleicos: A extração de DNA e RNA será feita a partir dos swabs (Isohelix), congelados imediatamente (-80°C) ou acondicionados diretamente na solução DNA/RNA shield (Zymo) imediatamente após a coleta. Após vortex e centrifugação, o volume da solução de preservação (150 µl) será usado para extração de DNA e RNA usando o kit Recover all (Thermo, USA) seguindo o protocolo padrão. A presença do Sars-CoV-2 será avaliada nesta amostra por ensaio de qRT-PCR usando sondas TaqMan (TaqMan 2019NCOV assay kit V1 - Thermo, USA ou equivalente), conforme protocolo do kit. Com nanogramas de ácidos nucleicos extraídos a partir de dois swabs, e das amostras de fezes (~1g de fezes) coletados de cada paciente/controle, serão misturados e usados para a síntese de cDNA usando hexâmeros randômicos e a enzima SuperScript III (Thermo, USA), os quais serão usados para a construção da biblioteca com Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, EUA). Será preparado um mix contendo 5µl de Tagment Buffer, 2,5µl de Amplicon Tagment Mix e 2,5µl de DNA amplificado (diluído para 1,2ng/µl). Essa reação será incubada a 55°C por 4 min para o processo de tagmentação. Será adicionado 2,5µl de Neutralize Tagment Buffer para suspender o processo. Serão adicionados então os componentes: 2,5µl de primer 1 (i7, N70X diferente para cada amostra) 2,5µl de primer 2 (i5, S50X diferente para cada amostra) e 7,5µl de Nextera PCR master mix. Em seguida a reação será incubada no termociclador (72°C por 3 min, 15 ciclos de 95°C por 30 sec, seguido por 15 ciclos de 95°C por

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

10 sec, 72°C por 15 sec e resfriando até 4°C). As bibliotecas serão purificadas com AMPure magnetic beads. Será adicionado 15l das esferas magnéticas a 25l de produto de PCR, que será incubado a temperatura ambiente por 5 min e posicionado no suporte magnético por 2 min para ligação das esferas ao ímã. O sobrenadante será removido e as esferas serão lavadas utilizando 200l de etanol 80%. O etanol será removido e as bibliotecas serão eluídas das esferas utilizando 26,25l de Resuspension Buffer. Após ligação das esferas ao ímã, 25l do sobrenadante (contendo as bibliotecas purificadas) será transferido para novos tubos. A concentração das bibliotecas será determinada pelo Qubit (Thermo Fisher, EUA) e a distribuição de tamanhos dos fragmentos de DNA será determinada pelo Bioanalyzer (Agilent, EUA). As bibliotecas serão quantificadas por qPCR com o KAPA Library Quantification Kit (Illumina, EUA). Diluições de 1:500 e 1:5000 das bibliotecas serão preparadas para que fiquem dentro da curva padrão forne.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com idade maior ou igual a que 18 anos portadores de neoplasias hematológicas ou tumores sólidos e pacientes submetidos a qualquer tipo de TCH. O paciente elegível deve aceitar voluntariamente e fornecer consentimento informado. Os mesmos serão classificados como:

- a) Casos: presença de sintomas respiratórios e SARS-CoV-2 confirmado por teste molecular (preferencialmente por qRT-PCR com teste padronizado);
- b) Controles:
 - b.1. pacientes com as mesmas doenças neoplásicas de base e com sintomas respiratórios e ausência de SARS-CoV-2.
 - b.2. Pacientes com as mesmas doenças neoplásicas de base e sem sintomas respiratórios e ausência de SARS-CoV-2.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes com as mesmas doenças neoplásicas de base e com outros vírus respiratórios.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO (S) PRIMÁRIO (S)

- Definir respostas imunes sistêmicas e locais durante e após infecções pelo SARS-CoV-2 em receptores de TCH ou com neoplasias hematológicas ou com tumor sólido para determinar possível associação entre perfis imunológicos e desfechos clínicos, como sobrevida global (SG) em

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

1 e 3 meses, sobrevida livre de doença (SLP) em 12 meses e progressão para ITRI;

- Determinar por sequenciamento genético shotgun, se a composição e as mudanças longitudinais na microbiota de vias aéreas superiores e fecal resultantes da infecção pelo SARS-CoV-2 – incluindo bactérias, vírus e fungos - podem ser marcadoras de desfecho e tempo de viremia, afetando a sobrevida global (SG) em 1 e 3 meses, sobrevida livre de progressão (SLP) em 12 meses e o risco de progressão para ITRI, nos receptores de TCH ou pacientes com leucemia, ou pacientes com tumores sólidos.

- Usar os dados de shotgun sequencing para avaliar as alterações genéticas observadas nas variantes de SARS-CoV-2 circulando nos pacientes do estudo, correlacionando-as com desfecho e resposta ao tratamento.

- Determinar as mudanças no perfil metabólico em função da resposta à administração medicamentosa e de acordo com a evolução nos sintomas respiratórios. De modo específico, serão comparados os perfis metabólicos de três grupos de pessoas:

i) grupo controle composto por indivíduos saudáveis;

ii) grupo controle composto por pacientes com câncer; e iii) grupo com pacientes com câncer infectados com SARS-CoV-2.

Especificamente, a análise metabólica seguirá as seguintes etapas:

- 1) Obtenção do perfil metabólico de amostras de plasma sanguíneo dos grupos participantes na pesquisa mediante a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS);
- 2) identificação dos metabólitos cuja concentração relativa tenha sido alterada de forma estatisticamente significativa na comparação entre os grupos mediante análises uni- e multivariada;
- 3) interpretação biológica de tais metabólitos para contextualização dos resultados obtidos dentro da casuística do estudo.

- O estudo de GWAS será realizado em cooperação com o Consórcio liderado pelo National Institutes of Health (NIH, USA) em uma colaboração da Dra. Dirce Carraro, colaboradora desse estudo com os Drs. Stephen Chanock (NIH) e do Dr. Leandro Colli (USP-Ribeirão Preto). Os dados dos pacientes oncológicos com diagnóstico de Covid-19 desse estudo serão analisados juntamente com os dados da genotipagem de aproximadamente 40.000 pacientes, incluindo outros pacientes oncológicos, de outros países, principalmente dos Estados Unidos. Os dados de genotipagem dos pacientes desse estudo serão disponibilizados para serem utilizados em uma

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

análise integrada com os demais resultados das outras abordagens “Ômicas” e do perfil imune.

OBJETIVO (S) SECUNDÁRIO (S)

- Compreender melhor os efeitos das subpopulações de células imunes e citocinas/ quimiocinas na progressão e gravidade das infecções pelo SARS -CoV-2 e câncer;
- Realizar uma análise da interação entre os perfis imunes e o microbiota e medidas clínicas de doenças respiratórias e câncer;
- Avaliar o papel do “interferoma”, ou seja, a expressão gênica de genes modulados por interferon, na resposta imune sistêmica e local, nos diferentes grupos de pacientes infectados por SARS-CoV-2 incluídos neste estudo [25].
- Identificação de proteínas e metabólitos na evolução da infecção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes receptores de transplante de células hematopoieticas, com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos.
- Identificação de variantes genéticas de susceptibilidade a manifestação de sintomas graves nesta população.
- Determinar os dias livres de ventilação mecânica nos pacientes que evoluíram para SARS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Não há riscos adicionais pois os sujeitos do estudo serão submetidos a procedimentos padrões do cuidado médico e tratamento com drogas já conhecidas e aprovadas.

BENEFÍCIOS

Benefícios/Riscos potenciais da pesquisa para os participantes: Os potenciais benefícios são relacionados ao uso de tratamento com HCL ou tocilizumab para tratar as formas graves da COVID-19 e os potenciais riscos serão os mesmos envolvidos nas práticas clínicas rotineiras de coleta de sangue, como flebite e hematoma, a coleta dos lavados nasais e eventuais coletas de lavado bronchoalveolar fazem parte da rotina de cuidado e manejo dos pacientes com infecção por vírus respiratórios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 01

Os documentos alterados na presente emenda foram:

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

1. PROJETO DETALHADO (Projeto_Coronavirus_E1.pdf) – postado na Plataforma Brasil em 10/06/2021.
2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Tematico_Corona_TCLE_V4.pdf) – postado na Plataforma Brasil em 10/06/2021.
3. FOLHA DE ROSTO (folhaDeRosto_Emenda_a.pdf) – postado na Plataforma Brasil em 10/06/2021.

Justificativa da Emenda:

1. Mudança do título de: "Determinação de fatores de risco, resposta imune e microbioma/viroma na evolução da infecção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes receptores de transplante de células hematopoiéticas, com neoplasias hematológicas ou tumores sólidos tratados ou não com hidroxicloroquina e/ou tocilizumabe" Para "Determinação de fatores de risco associados a resposta imune, microbioma/viroma e metabólica na evolução da infecção pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2) em pacientes oncológicos diagnosticados com COVID-19".

2. Inclusão de centro Coparticipante Centro:

Instituto de Química - UNICAMP

Pesquisadores: Dra. Valéria Colnaghi Simionato - Laboratório de Análise de Biomoléculas Tiselius

Hans Rolando Zamora Obando - Laboratório de Análise de Biomoléculas Tiselius

3. Inclusão no resumo e no corpo do projeto dos novos dois objetivos referentes a Metabolômica e GWAS.

4. Devido falta de evidência no tratamento com HCL e IL-6, no momento do projeto, os mesmos foram excluídos de todo corpo do projeto.

5. Atualizado o Cronograma.

6. Atualizado o TCLE, anexada versão nova na PB, Versão 4.

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

LISTA ATUALIZADA DE CENTROS:

- Instituto de Química - UNICAMP; Responsável: Ana Valéria Colnaghi Simionato.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1704696_E1.pdf	11/06/2021 16:24:45		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Emenda_a.pdf	11/06/2021 16:22:21	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tematico_Corona_TCLE_V4.pdf	10/06/2021 18:25:10	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	emenda1_Descricao_modificacoes_projeto.pdf	10/06/2021 18:11:16	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Coronavirus_E1.pdf	10/06/2021 18:10:16	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_pesquisa.pdf	25/05/2021 17:02:46	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3990283.pdf	26/04/2020 17:37:14	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3990283.docx	26/04/2020 17:35:36	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_Ciencia_COMPROMETIMENTO_comite_seguranca_externo_DraGisele.pdf	26/04/2020 17:15:02	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_Ciencia_COMPROMETIMENTO_comite_seguranca_externo_DraGisele.pdf	26/04/2020	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

Outros	IMENTO_comite_seguranca_externo_Dr Raphael Araujo.pdf	17:14:30	BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_CIENTIA_COMPROMETIMENTO_comite_seguranca_externo_DraDanieli.pdf	26/04/2020 17:13:48	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	TERMO_COMPROMISSO_PESQUISA DOR EAG COVID19.pdf	25/04/2020 13:05:08	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Tematico_Corona_TCLE_V3_modificacoes.docx	21/04/2020 16:54:33	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CoronavirusV3.pdf	21/04/2020 16:52:52	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Projeto_Coronavirus_modificacoes.doc	21/04/2020 16:51:01	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3982394.docx	21/04/2020 16:49:56	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3982394.pdf	21/04/2020 16:49:23	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tematico_Corona_TCLE_V3.pdf	21/04/2020 16:46:35	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Parecer_CONEP_3949663.docx	13/04/2020 18:11:20	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_COMPROMISSO_PESQUISA DOR COVID19.pdf	27/03/2020 09:01:03	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	FORMULARIO_SUBMISSAO_PROJETO COVID19.pdf	26/03/2020 22:01:32	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_COVID19.pdf	26/03/2020 21:31:57	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_DADOS_COLETADOS COVID 19.jpg	26/03/2020 18:09:38	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	Identificacao_Curriculos_na_Plataforma Lattes COVID19.pdf	26/03/2020 17:23:42	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_CIENTIA_COMPROMETIMENTO UTI covid.pdf	26/03/2020 17:08:05	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_USO_DESTINO_MATERIAIS_BIOLOGICO_COVID19.pdf	26/03/2020 01:22:01	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_CIENTIA_COMPROMETIMENTO Oncoclinica covid.pdf	26/03/2020 01:18:36	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_CIENTIA_COMPROMETIMENTO Oncohemato covid.pdf	26/03/2020 01:17:51	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Declaração de concordância	DECLARACAO_CIENTIA_COMPROMETIMENTO Infectologia covid.pdf	26/03/2020 01:16:16	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.972.137

Orçamento	Orcamento_financeiro_detalhado_COVID_19.pdf	26/03/2020 01:14:44	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra_Hospital.pdf	26/03/2020 01:12:22	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra_CIPE_laboratorio.pdf	26/03/2020 01:12:11	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito
Outros	DECLARACAO_PLANO_RECRUTAMENTO_PARTICIPANTES_PESQUISA_COVID_19.pdf	26/03/2020 01:09:45	MARJORIE VIEIRA BATISTA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 14 de Setembro de 2021

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

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

A)

COVID Leve

Células B CXCR5+CCR6+ (%)

Células DP CRTH2+CXCR3- (%)

Células NK CD45+CD56+CD3- (%)

Células T CD161+CD95- (%)

Células T CD4+ CD161+CD95- (%)

Células T CD8+ TIM-3+CD127- (%)

Células T PD-1+CD161- (%)

Células T PD-1+CD95+ (%)

Células T PD-1+LAG-3- (%)

Células Treg PD1+LAG-3- (%)

Células Treg TIM-3+CD127- (%)

Contagem de Monócitos

Contagem de Neutrófilos

Contagem de Plaquetas

Leucócitos CD3-TCRgd- (%)

CCL11 (pg/mL)

CCL2 (pg/mL)

CCL3 (pg/mL)

CCL4 (pg/mL)

CCL5 (pg/mL)

CSF2 (pg/mL)

CSF3 (pg/mL)

CXCL10 (pg/mL)

CXCL8 (pg/mL)

Dimeros-D (ng/mL)

FGF2 (pg/mL)

IFNγ (pg/mL)

IgA Nucleocapsid (FI)

IgA RBD (FI)

IgA Spike 1 (FI)

IgA Spike 2 (FI)

IgG Nucleocapsid (FI)

IgG RBD (FI)

IgG Spike 1 (FI)

IgG Spike 2 (FI)

IgM Nucleocapsid (FI)

IgM RBD (FI)

IgM Spike 1 (FI)

IgM Spike 2 (FI)

IL-10 (pg/mL)

IL-12A (pg/mL)

IL-13 (pg/mL)

IL-15 (pg/mL)

IL-17A (pg/mL)

IL-1RN (pg/mL)

IL-18 (pg/mL)

IL-2 (pg/mL)

IL-4 (pg/mL)

IL-5 (pg/mL)

IL-6 (pg/mL)

IL-7 (pg/mL)

IL-8 (pg/mL)

IL-9 (pg/mL)

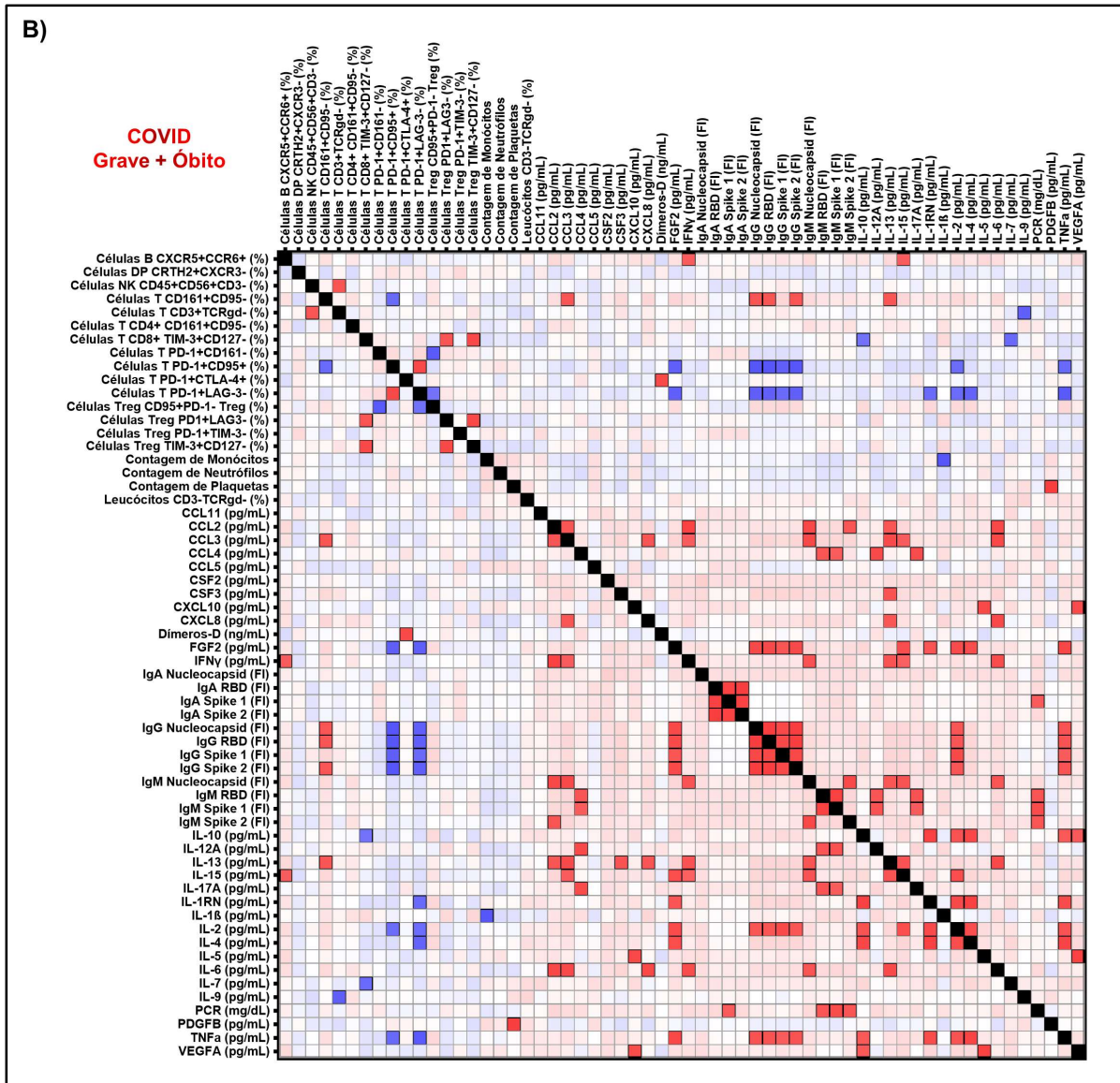
PCR (mg/dL)

PDGFB (pg/mL)

TNFA (pg/mL)

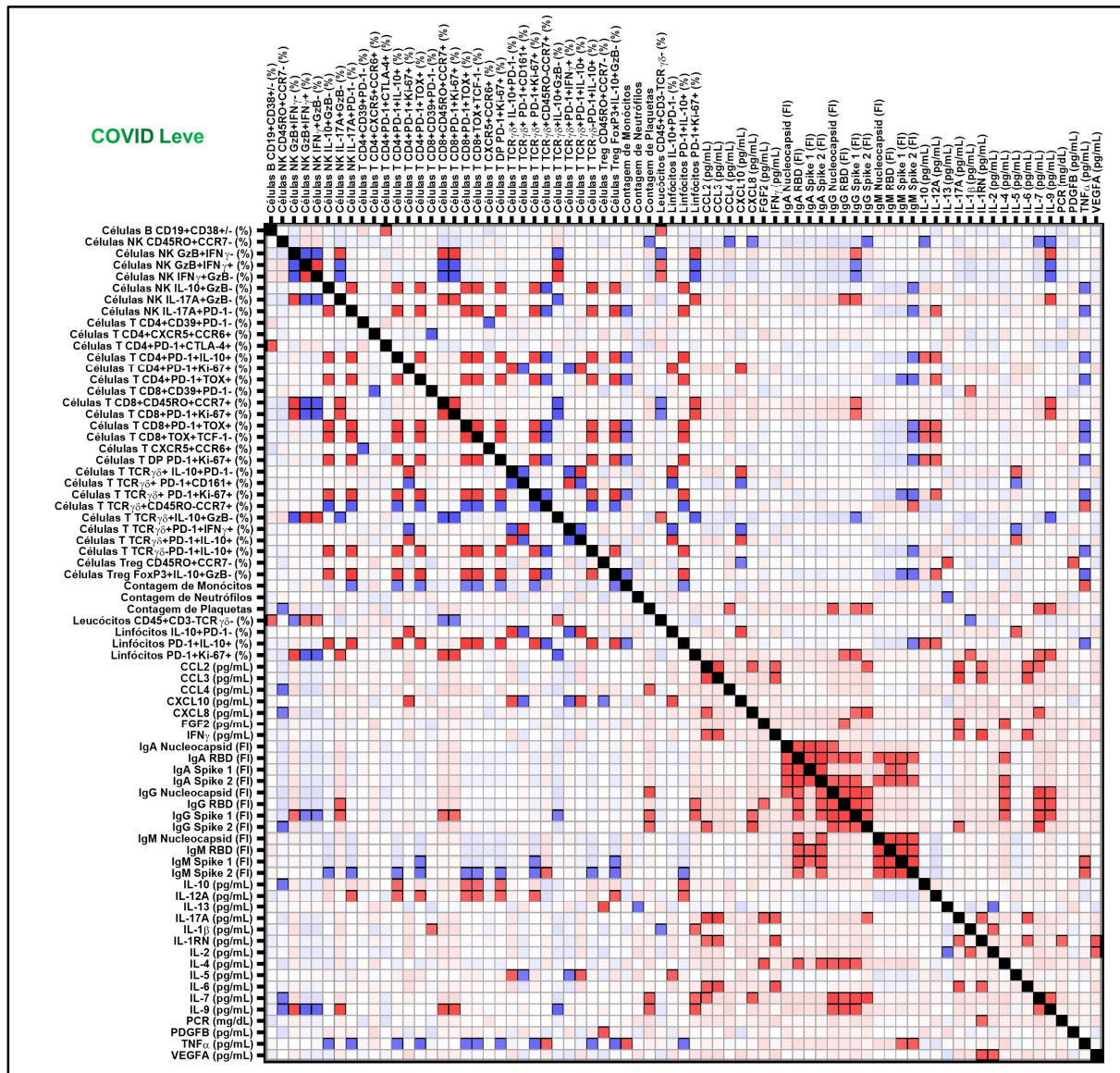
VEGFA (pg/mL)

131

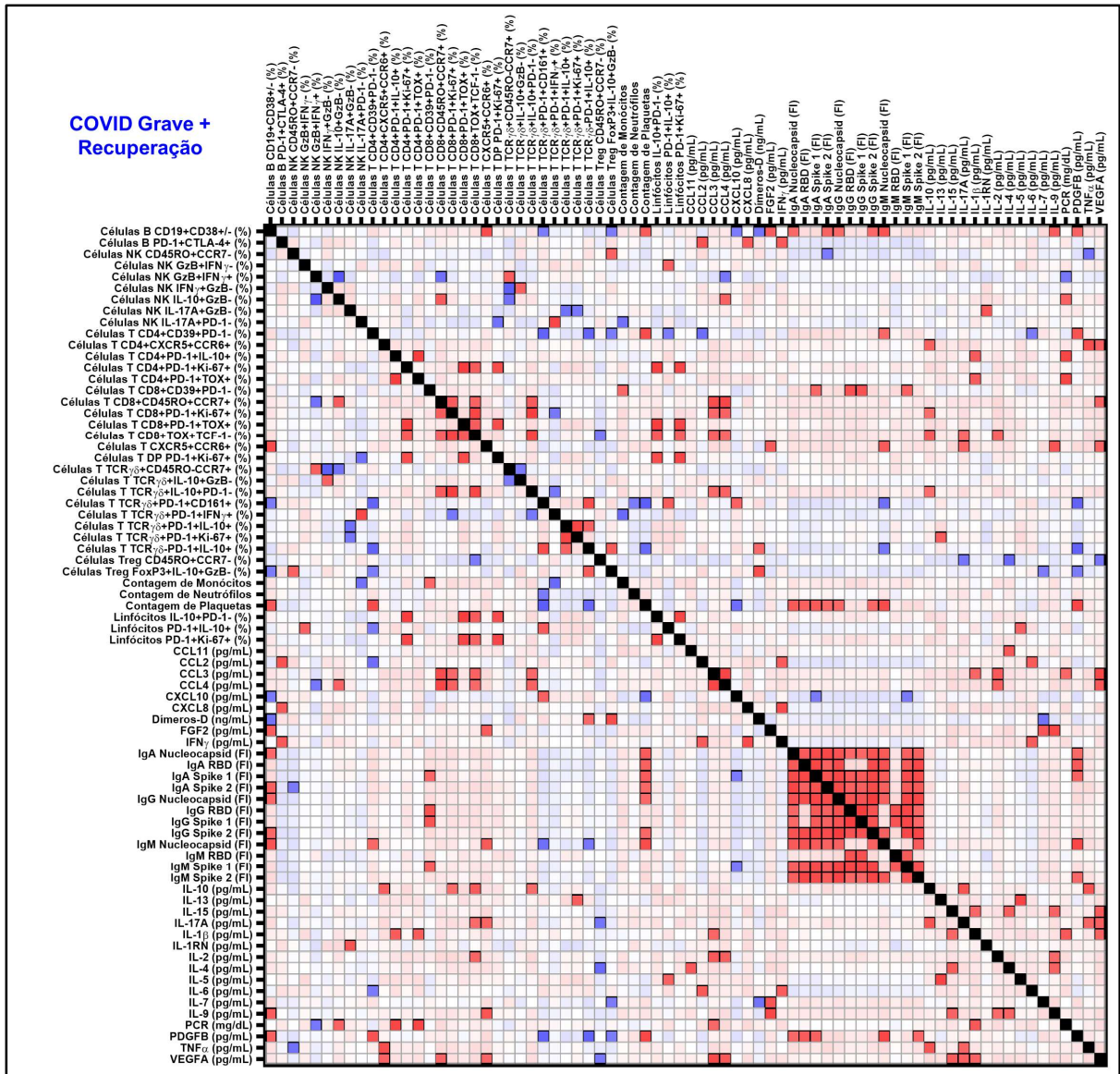


Apêndice 1 – Matriz de Correlação de pacientes com tumores hematológicos que faleceram em decorrência da COVID-19. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05) foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, destacando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05.

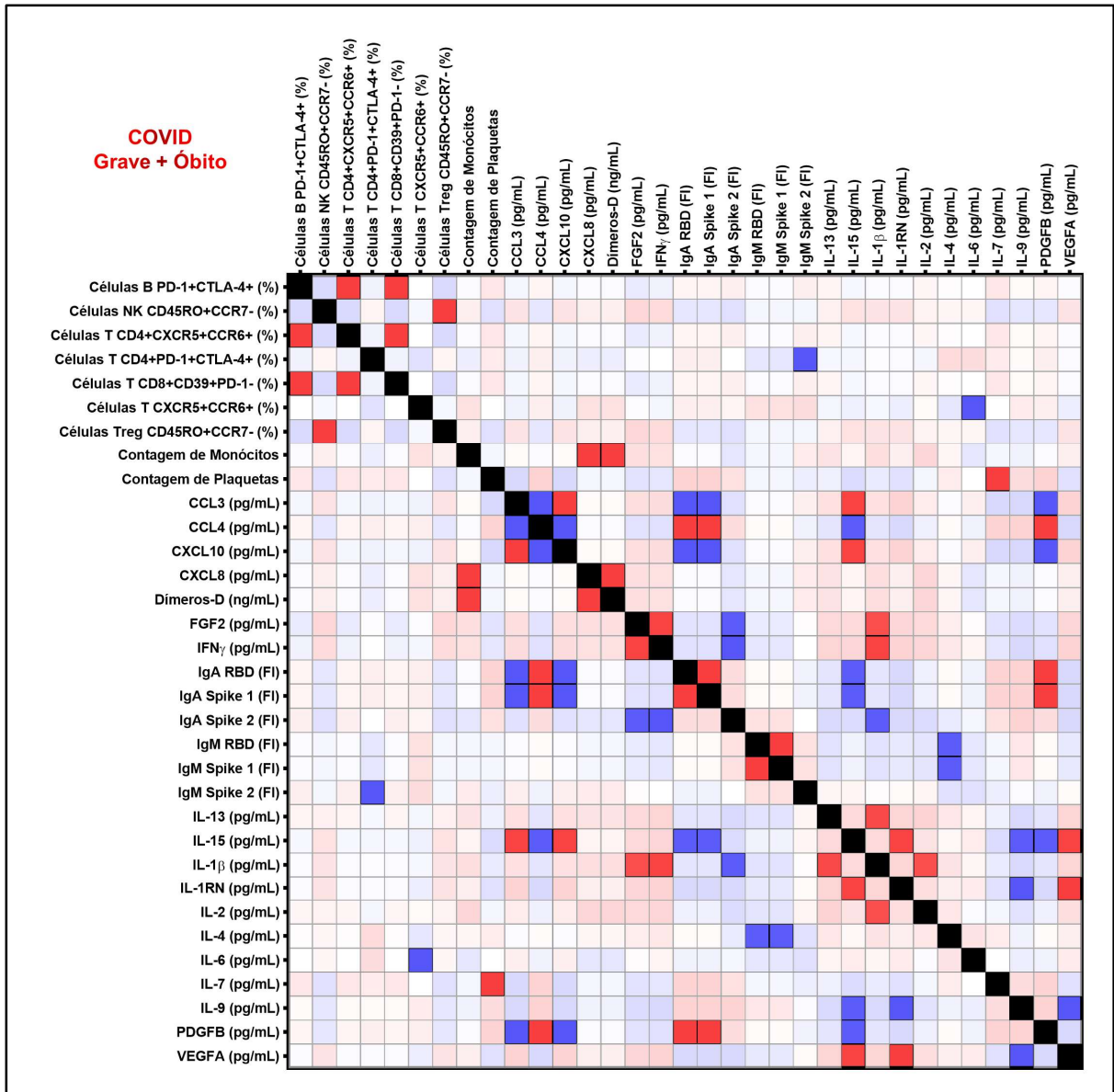
Apêndice 2 – Matrizes de Correlação – Coorte de pacientes com tumores sólidos



Apêndice 2 – Matriz de Correlação de pacientes com tumores sólidos e COVID-19 leve. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve, COVID Grave + Recuperação e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05) foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, destacando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05.



Apêndice 2 – Matriz de Correlação de pacientes com tumores sólidos que se recuperaram da COVID-19 grave. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve, COVID Grave + Recuperação e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05) foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, destacando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05.



Apêndice 2 – Matriz de Correlação de pacientes com tumores sólidos que faleceram em decorrência da COVID-19. Fatores com expressão diferencial entre pacientes com COVID Leve, COVID Grave + Recuperação e COVID Grave + Óbito (considerando *p*-valores iguais ou inferiores a 0,05) foram utilizados para construir matrizes de correlação de Spearman, destacando as interações com *p*-valores inferiores a 0,05.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Martijn van Griensven,
Maastricht University, Netherlands

REVIEWED BY
Marzena Lenart,
Jagiellonian University, Poland
Annalisa Chiocchetti,
Università del Piemonte Orientale, Italy

*CORRESPONDENCE
Kenneth J. Gollob
✉ kjgollob.einstein@gmail.com
Marjorie V. Batista
✉ marjorie.batista@accamargo.org.br

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 23 September 2022
ACCEPTED 20 December 2022
PUBLISHED 09 January 2023

CITATION
Pignataro-Oshiro F, Figueiredo AB,
Galdino NAL, Morais KLP, Dutra WO,
Silva BGdM, Feriani D, Abrantes FdA,
Silva ILAF, Filho JS, Framil Jvds,
Cesca MG, Riechelmann RSP,
Batista MV and Gollob KJ (2023)
Distinct systemic immune networks
define severe vs. mild COVID-19 in
hematologic and solid cancer patients.
Front. Immunol. 13:1052104.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1052104

COPYRIGHT
© 2023 Pignataro-Oshiro, Figueiredo,
Galdino, Morais, Dutra, Silva, Feriani,
Abrantes, Silva, Filho, Framil, Cesca,
Riechelmann, Batista and Gollob. This is
an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use,
distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

Distinct systemic immune networks define severe vs. mild COVID-19 in hematologic and solid cancer patients

Flávio Pignataro-Oshiro¹, Amanda B. Figueiredo¹,
Nayane A. L. Galdino¹, Katia L. P. Morais¹,
Walderez O. Dutra², Bianca Grassi de Miranda Silva³,
Diego Feriani³, Flávia de Azevedo Abrantes³,
Ivan Leonardo Avelino França e Silva³, Jayr Schmidt Filho⁴,
Juliana Valéria de Souza Framil³, Marcelle Goldner Cesca⁵,
Rachel Simões Pimenta Riechelmann⁵, Marjorie V. Batista^{3*}
and Kenneth J. Gollob^{1,6*}

¹International Research Center, Translational Immuno-oncology Group, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, ²Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Infectious Diseases Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, ⁴Hematology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, ⁵Clinical Oncology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, ⁶Hospital Israelita Albert Einstein, Israelite Institute for Education and Research, Translational Immuno-oncology Laboratory, São Paulo, Brazil

Introduction: The COVID-19 pandemic, caused by the coronavirus SARS-CoV-2, has impacted health across all sectors of society. A cytokine-release syndrome, combined with an inefficient response of innate immune cells to directly combat the virus, characterizes the severe form of COVID-19. While immune factors involved in the development of severe COVID-19 in the general population are becoming clearer, identification of the immune mechanisms behind severe disease in oncologic patients remains uncertain.

Methods: Here we evaluated the systemic immune response through the analysis of soluble blood immune factors and anti-SARS-CoV-2 antibodies within the early days of a positive SARS-CoV-2 diagnostic in oncologic patients.

Results: Individuals with hematologic malignancies that went on to die from COVID-19 displayed at diagnosis severe leukopenia, low antibody production against SARS-CoV-2 proteins, and elevated production of innate immune cell recruitment and activation factors. These patients also displayed correlation networks in which IL-2, IL-13, TNF-alpha, IFN-gamma, and FGF2 were the focal points. Hematologic cancer patients that showed highly networked and coordinated anti-SARS-CoV-2 antibody production, with central importance of IL-4, IL-5, IL-12A, IL-15, and IL-17A, presented only mild COVID-19. Conversely, solid tumor patients that had elevated levels of inflammatory

cytokines IL-6, CXCL8, and lost the coordinate production of anti-virus antibodies developed severe COVID-19 and died. Patients that displayed positive correlation networks between anti-virus antibodies, and a regulatory axis involving IL-10 and inflammatory cytokines recovered from the disease. We also provided evidence that CXCL8 is a strong predictor of death for oncologic patients and could be an indicator of poor prognosis within days of the positive diagnostic of SARS-CoV-2 infection.

Conclusion: Our findings defined distinct systemic immune profiles associated with COVID-19 clinical outcome of patients with cancer and COVID-19. These systemic immune networks shed light on potential immune mechanisms involved in disease outcome, as well as identify potential clinically useful biomarkers.

KEYWORDS

SARS-CoV-2, COVID-19, cancer, systemic immune profile, disease severity prediction, cytokine-release syndrome

Introduction

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) is an illness caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2), identified following an outbreak of unknown pneumonia cases during 2019. The etiological agent was classified as a betacoronavirus closely related to Severe Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), associated with outbreaks in 2002 and 2012, respectively (1).

Patients infected by SARS-CoV-2 primarily present with fever, cough, shortness of breath, dyspnea, lung infiltration and possibly respiratory failure, depending on the disease severity (1). The symptoms are partially explained by the virus' biology, which leads to infection of cells *via* proteases and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), present in respiratory tract tissues (1). The acute respiratory distress syndrome observed in COVID-19 is believed to be due to a cytokine-release syndrome, lack of immune regulation, and may be associated with multiple-organ failure (2).

Typically about 80% of the cases are classified as mild, 15% as severe and 5% as critical (1). Nevertheless, data from May 2020 reported that about 90% of the registered cases in Brazil resulted in hospitalization, of which 30% were admitted to intensive care units (ICU) (3). Later on, in 2021, 99% of the cases reported in the Brazilian Healthcare System database (DATASUS) had resulted in hospitalization, of which 36% needed ICU admissions, culminating in a rate of death approximately 37% (4). By October 2022, Brazil had more than 34 million confirmed cases, and almost 688,000 deaths,

reaching a lethality of 2% (5). It is important to take into consideration that that Brazil is a country with a unique healthcare system, an expressive prevalence of comorbidities among its population, and that its national vaccination campaign had a very good coverage once implemented, explaining in parts both the high rates of hospitalization and ICU admissions in 2020 and 2021, and the progressively lower infection and lethality rates by 2022 (4, 6).

In general, male individuals aged 60 or above, with chronic cardiovascular or respiratory conditions, hypertension, obesity or diabetes have increased risk of severe disease and death (1, 2). Individuals with cancer specifically present lower survival rates (7, 8) with case-fatality percentages ranging from 11% to 26% (9), and higher chances of hospitalization and death compared to those from the general population (10). In patients with cancer the risk of developing severe COVID-19 is associated with hematologic malignancies, non-white race, age 65 or above, chronic lymphopenia, use of corticosteroid combined with immune checkpoint inhibitors therapy, former or current smoker status, hypertension, and chronic kidney, cardiac or lung disorders (9, 10). Within the hematological malignancies, acute myeloid leukemia, aggressive non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma and plasma cell malignancies were associated with a greater risk of hospitalization and death (10). Similarly, some solid tumor patients also showed higher risk of severe COVID-19 than the general population (8, 11, 12). In Brazil, a study demonstrated that an increased chance of death in cancer patients was associated with lung and hematological tumors (13).

Oncologic patients, and in particular those with hematologic malignancies, often display immunosuppression as a

consequence of cancer progression or of therapeutic interventions (14). We hypothesize that specific systemic immune response profiles in cancer patients may be related to distinct COVID-19 clinical outcomes and that these profiles could potentially be used to predict COVID-19 progression. Thus, we investigated systemic soluble factor immunoregulatory networks in oncologic COVID-19 patients with differential clinical outcomes. We identified specific immune mediators and networks associated with hematologic malignancy patients that maintained mild COVID-19 vs. those that develop severe disease and death. These findings advance our understanding of immune imbalances related to severe COVID-19 in oncologic patients and point towards potentially clinically useful immune markers of severity in oncological patients.

Results

Hematologic or solid tumor cancer patients display distinct outcomes of COVID-19

We separated the oncological patient cohorts into hematologic cancers ($n = 21$) and solid tumors ($n = 22$) based on previous studies demonstrating distinct clinical outcomes in cancer patients with COVID-19 (8, 11, 12). We further segregated COVID-19 disease severity in Mild, Severe-Recovered, and Severe-Death depending on the use of supplemental oxygen therapy, based on recommendations by the World Health Organization (Figure 1A). A summary of patient characteristics,

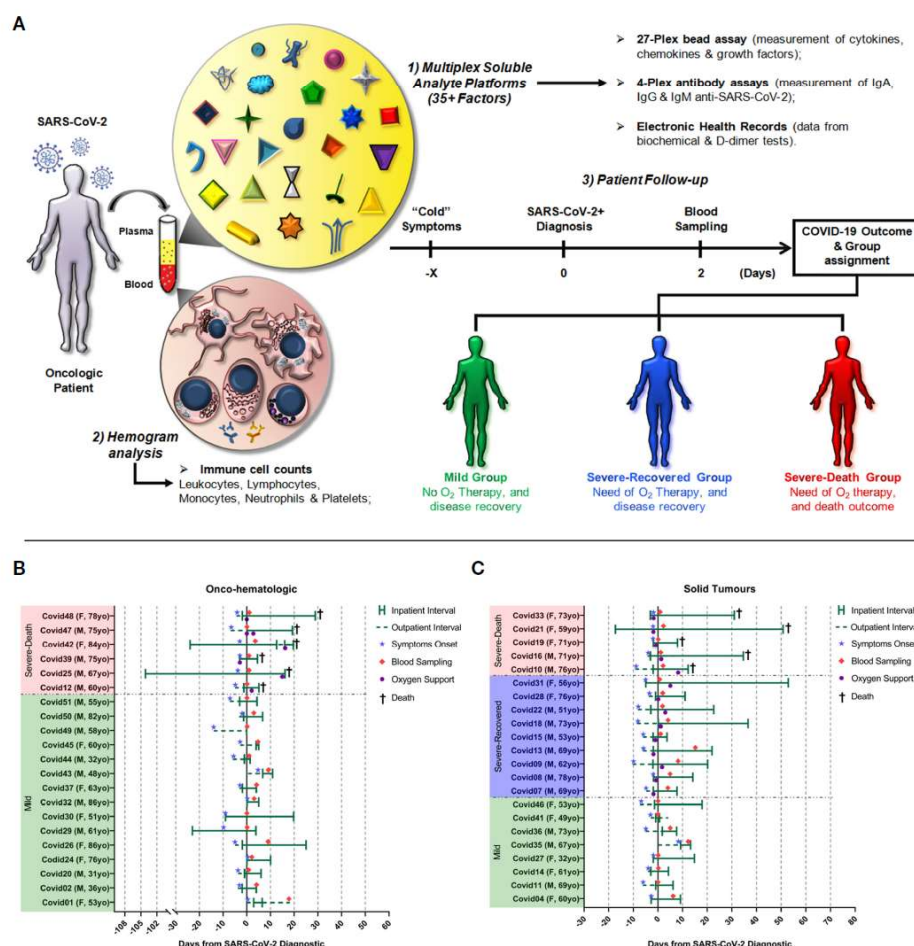


FIGURE 1

Experimental design, cohort clinical characteristics and timeframe of sampling utilized in the study. The first illustration (A) represents the experimental design of this study. Briefly, oncologic patients from A.C. Camargo Cancer Center that had a positive diagnostic of SARS-CoV-2 infection were invited to participate in the study. Blood samples were drawn at a median of two days after the confirmed diagnostic and analyzed for the concentrations of soluble factors and cell counts. Then each patient was followed-up and assigned to a group based on the need of supplemental O₂ therapy and outcome of COVID-19. Below, the illustration represents the timeframe of hospitalization, symptoms onset, blood sampling and clinical complications (need of oxygen supplementation and death) observed in hematologic cancer (B) or solid tumor (C) patients. Time zero was defined as the day of the positive SARS-CoV-2 qPCR positive diagnostic.

including the timeframe of hospitalization, onset of symptoms, blood sampling and clinical complications observed during COVID-19 is shown (Figures 1B, C). Individuals with hematologic malignancies displayed a distinct COVID-19 evolution as compared to patients with solid tumors, showing either mild disease or severe disease with progression to death, whereas 41% of the patients with solid tumors developed severe COVID-19 but recovered. Further epidemiological information, such as age and sex distribution, tumor type, treatments, Eastern Cooperative Oncologic Group (ECOG) performance status score and cancer status is presented in Table 1 and Supplementary Figure 1.

Patients with hematologic malignancies that presented leukopenia, lower anti-SARS-CoV-2 antibody production, and higher expression of inflammatory factors went on to die from COVID-19

To address the potential impact of hematological alterations on COVID-19 progression and outcome, we first evaluated biochemical and hematological parameters assessed at the time of the SARS-CoV-2 infection diagnosis (Figure 2). Patients with hematologic malignancies that presented with leukopenia, which reflected a decrease in lymphocytes and monocytes (Figure 2A), went on to die from COVID-19 (Severe-Death group). In addition, hematocrit and hemoglobin values were also lower in Severe-Death hematologic patients, as compared to Mild (Figure 2B), while neutrophil and platelet numbers did not differ between groups (not shown). Conversely, biochemical analysis showed augmented levels of CRP and D-dimer in the Severe-Death hematologic cancer patients as compared to the Mild group (Figure 2C), whereas none of the hematological or biochemical parameters differed between solid tumor patients with distinct clinical outcomes (Figures 2A–C).

Next, we aimed to better understand the mechanisms related to disease evolution and clinical outcome. To do so we evaluated circulating soluble mediators in plasma sampled within a median of two days of SARS-CoV-2 positive diagnostic (Figure 3).

Within the hematologic cancer patient cohort there was a striking increase in the levels of the chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8, and the cytokine IL-1 β , in the Severe-Death group compared to the Mild group (Figure 3A). Levels of VEGFA and most of the cytokines measured (IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17A and IL-1RN) were also increased or showed similar trends in Severe-Death hematologic patients as compared to Mild, with no differences in FGF2, PDGFB, and TNF α concentrations (Figures 3B, C). No difference was observed for CCL5, CCL11, Colony Stimulating Factor 2 (CSF2), Colony Stimulating Factor 3 (CSF3), IFN- γ , IL-7, IL-9, as well as IL-12A or IL-4, critical for T_H1 and T_H2 subset polarization, respectively (Supplementary Figure 2).

Conversely, patients with solid tumors had fewer changes in the levels of soluble factors than that observed in the hematologic group (Figure 3), displaying higher concentrations of CXCL8 among patients that went to die compared to those who recovered (Figure 3A). The concentration of IL-6 was increased in patients with severe disease that progressed to death as compared to Mild, while a similar trend was observed for CCL3, CXCL8, FGF2, and TNF α (Figures 3A–C). The growth factor PDGFB presented a trend toward a decrease in concentration comparing patients with mild disease and those who would die from COVID-19 (Figure 3B). In addition, IL-15 showed a trend to increase in patients that had severe disease and recovered, as compared to those in the Mild group (Figure 3C).

Lastly, we determined the levels of IgA, IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid, spike proteins (spike 1 and spike 2), and receptor binding domain (RBD) in patients with different tumors and COVID-19 outcomes (Figure 4). Interestingly, we observed an overall decrease in levels of IgM and IgG anti-SARS-CoV-2 proteins in the hematologic cancer patients that would die from COVID-19 (Figures 4B, C), while no changes were observed in IgA levels (Figure 4A). We also observed a dramatic decrease in IgM anti-nucleocapsid comparing individuals who progressed to death with those who cured among the solid tumor patients (Figure 4C). An overview of the mean antibody production is represented with radar charts for both hematologic malignancies patients (Figure 4D) and solid tumors patients (Figure 4E), showing a similar pattern of antibody synthesis from different immunoglobulin classes.

Unsupervised cluster and network analysis identifies immunological parameters that segregate death from other clinical outcomes in patients with hematologic tumors

To identify combinations of factors that segregate among distinct COVID-19 clinical outcomes we performed an unsupervised cluster analysis within each cancer group, considering only factors with a p-value of 0.1 or below. Hematologic cancer patients segregated based on a major cluster of high production of immune mediators in the Severe-Death group, together with lower levels of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 proteins and lower counts of leukocyte subpopulations (Figure 5A). The solid tumor groups separated the Severe-Death patients in one branch characterized by higher production of soluble immune factors and lower production of IgM. This branch also contained patients with other outcomes, whereas the remainder of patients that had mild COVID-19 or recovered from the disease grouped in secondary branches (Figure 5B). Categorical patient data, such as chemotherapy one month prior to COVID-19 diagnostic, presence of leukopenia,

TABLE 1 Clinical and demographic characteristics of COVID-19 hematologic cancer and solid tumor patients.

	Onco-hematologic (n = 21)		Solid Tumor (n = 22)		
	Mild (n = 15)	Severe-Death (n = 6)	Mild (n = 8)	Severe-Recovered (n = 9)	Severe-Death (n = 5)
Age					
Median	58	75	60.5	69	71
Range	31-86	60-84	32-73	51-78	59-76
p-value (median)*	p = 0.0990		p = 0.1459		
p-value (Fisher) [#]	p = 0.0456		p = 0.9999		
Sex					
Female	6 (40%)	2 (33%)	5 (63%)	2 (22%)	3 (60%)
Male	9 (60%)	4 (67%)	3 (37%)	7 (78%)	2 (40%)
p-value (Fisher) [#]	p = 0.9999		p = 0.6241		
ECOG Score					
Zero	12 (80%)	3 (50%)	6 (75%)	6 (67%)	2 (40%)
I-II	3 (20%)	2 (33%)	2 (25%)	3 (33%)	2 (40%)
III-IV	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
p-value (Fisher) ^{\$}	p = 0.2857		p = 0.2273		
Hematological Malignancy					
Lymphoma	9 (60%)	2 (33%)	NA	NA	NA
Leukemia	2 (13%)	1 (17%)	NA	NA	NA
Myeloma	2 (13%)	3 (50%)	NA	NA	NA
Other hematological	2 (12%)	0 (0%)	NA	NA	NA
Solid Tumor					
Breast	NA	NA	3 (38%)	0 (0%)	0 (0%)
Digestive Organs	NA	NA	2 (25%)	1 (11%)	3 (60%)
Prostate	NA	NA	2 (25%)	1 (22%)	0 (0%)
Urinary Tract	NA	NA	0 (0%)	2 (22%)	2 (40%)
Lungs	NA	NA	0 (0%)	2 (22%)	0 (0%)
Reproductive System	NA	NA	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)
Other	NA	NA	1 (12%)	2 (22%)	0 (0%)
Comorbidities					
Diabetes	3 (20%)	2 (33%)	2 (25%)	2 (22%)	2 (40%)
Obesity	1 (7%)	1 (17%)	2 (25%)	2 (22%)	0 (0%)
Cardiac Disease	6 (40%)	6 (100%)	4 (50%)	7 (78%)	2 (40%)
Neurologic Disease	0 (0%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Pulmonary Disease	1 (7%)	0 (0%)	1 (12%)	3 (33%)	0 (0%)
Renal Disease	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (22%)	0 (0%)
Smoker (Current)	1 (7%)	0 (0%)	1 (12%)	1 (11%)	0 (0%)
(Continued)					

TABLE 1 Continued

	Onco-hematologic (n = 21)		Solid Tumor (n = 22)		
	Mild (n = 15)	Severe-Death (n = 6)	Mild (n = 8)	Severe-Recovered (n = 9)	Severe-Death (n = 5)
Smoker (Former)	2 (13%)	2 (33%)	3 (38%)	2 (22%)	1 (20%)
Former Infection ^{&}	2 (13%)	2 (33%)	0 (0%)	3 (33%)	0 (0%)
Treatment (Cancer)					
Cell Transplant	3 (20%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Chemotherapy	12 (80%)	5 (83%)	5 (63%)	7 (78%)	4 (80%)
Immuno (Anti-CD20)	1 (7%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Immuno (Anti-CD38)	1 (7%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Immuno (PD-1 Axis)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Radiotherapy	2 (13%)	0 (0%)	2 (25%)	5 (56%)	2 (40%)
Surgery	4 (27%)	0 (0%)	5 (63%)	5 (56%)	4 (80%)
Targeted Therapy	0 (0%)	0 (0%)	1 (12%)	2 (22%)	0 (0%)
Cancer Status					
Under Investigation	5 (33%)	2 (33%)	1 (12%)	0 (0%)	1 (20%)
Stable Disease	5 (33%)	1 (17%)	4 (50%)	8 (89%)	3 (60%)
Remission	4 (27%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)
Progression	1 (7%)	2 (33%)	3 (38%)	1 (11%)	0 (0%)

*Considering alive vs. deceased patients (Mann-Whitney test).
[&]Considering alive vs. deceased patients to verify if death outcome is influenced by age (Fisher's exact test).
[&]Considering alive vs. deceased patients, comparing individuals with ECOG scores 0-2 vs. 3-4 (Fisher's exact test).
[&]Refers to pulmonary infections or chronic infections of the urinary system.
 Bold values indicate p<0.05.

gender, ECOG score, or tumor grade, did not cluster together with disease outcome. A similar segregation of groups was seen using all the factors analyzed in this project (Supplementary Figure 3).

To further investigate immunoregulatory mechanisms involved in the response against SARS-CoV-2 and differential clinical outcomes, we generated correlation matrices and functional networks between the soluble immune mediators, anti-SARS-CoV-2 antibodies, leukocyte counts and biochemical indicators.

In patients with hematologic malignancies, we observed striking positive correlations regarding antibody responses in Mild patients, as well as a co-regulation of immunoregulatory cytokines, many of which were missing in those who progressed to death (Figures 6A, B). Additionally, we identified a negative correlation between the immunoregulatory cytokine IL-10 and general IgM antibody responses in patients with mild disease, which was not observed in those who progressed to death (Figure 6A). In the Mild group, network analysis also showed several hierarchical interactions, with IL-4, IL-5, IL-12A, IL-15, and IL-17A as major nodes interacting with many immune

mediators (Figure 6A). The cytokine IL-15 showed positive correlations with 13 immune factors, including IL-2, IL-12A, IFN- γ , and anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid and spike 2 IgG, classic markers of a T_H1 type immune response (Figure 6A; Supplementary Figure 4A). The anti-inflammatory cytokine IL-10 increased with increasing levels of IL-5 and D-dimer, indicating a potential coregulation of inflammatory responses. IL-10 also correlated negatively with several IgA and IgM anti-SARS-CoV-2 antibodies. In Severe-Death patients, we observed a bigger impact for interactions formed by the inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-2, which had positive correlations with anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies, IL-1RN, IL-4, IL-10 and FGF2 (Figure 6B). Further positive interactions were formed between the inflammatory cytokines IL-6, IL-15 and IFN- γ with different chemokines and IL-13, of which the majority had elevated concentrations in the Severe-Death as compared to the Mild group (indicated by red stars). Lastly, interactions between antibodies decreased among Severe-Death patients in comparison with Mild patients, whereas overall Spearman's rho values increased with disease severity, highlighting the

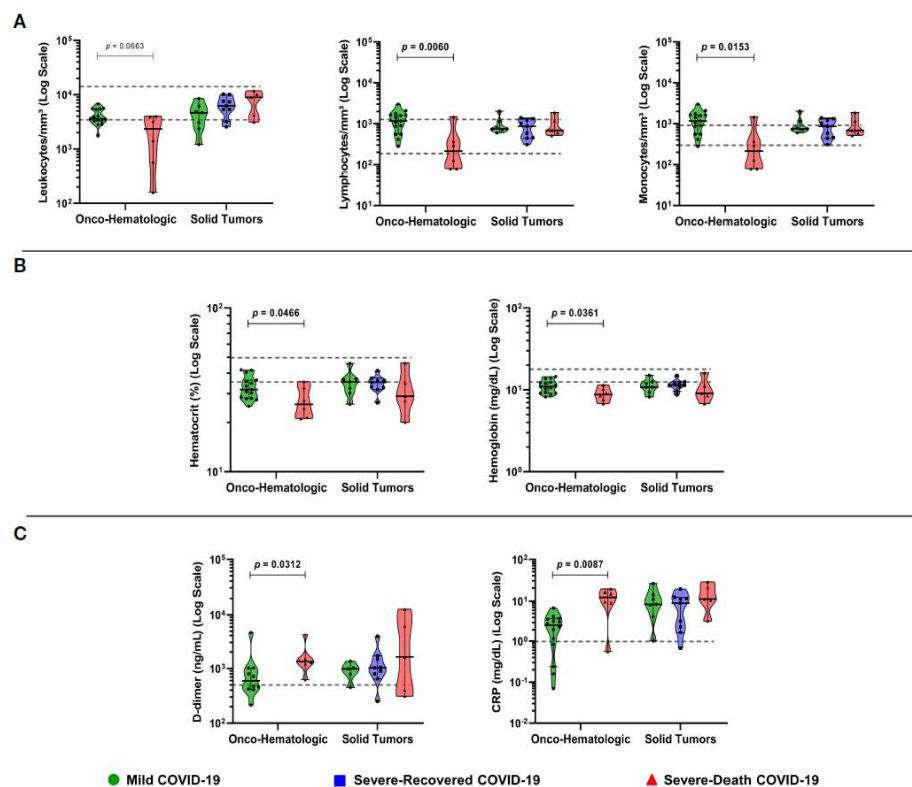


FIGURE 2

Biochemical and hematological analysis of plasma reveals that low numbers of leukocyte subpopulations are associated with death in patients with hematologic malignancies. Blood samples were collected within two days (median; 1–4 CI) of the positive SARS-CoV-2 diagnosis, while hemogram and biochemical exams data were gathered from electronic health records. The graphs depicts leukocytes and subpopulations (A), hematologic parameters (B), and biochemical parameters (C). Groups were defined based on disease severity, as Mild (green), Severe-Recovered (blue), or Severe-Death (red), as described. Gray dashed lines indicate the reference value ranges for each exam. Data is presented as median plus 95% confidence intervals and was analyzed with Kruskal-Wallis adjusted for multiple comparisons followed by Dunn's *post-hoc* test or Mann-Whitney test. All exact *p*-values below 0.1 are shown. CRP, C-Reactive Protein; N = 21 for Onco-hematologic and N = 22 for Solid tumors group.

exacerbated immune response (Figures 6A, B; Supplementary Figure 4A). Overall, these findings point to a broad and regulated immune response among hematologic patients who developed mild COVID-19, whereas patients that showed early signs of cytokine-release syndrome, lack of humoral responses and poor immunoregulatory networks progressed to death.

On the other hand, the networks from solid tumor patients were distinct from those seen in patients with hematologic malignancies, highlighting different immune mechanisms behind COVID-19 progression and outcome (Figures 6 and 7). Correlation matrices indicate that patients who progressed to mild or recovered from severe COVID-19 presented several positive correlations among the immunological parameters analyzed, which were virtually lost in Severe-Death patients (Figure 7). One of those was the striking positive correlations regarding antibody responses in Mild and Severe-Recovered patients, which were not observed in Severe-Death group (Figure 7). Interestingly, a cluster of positively correlated

inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IFN- γ and FGF2) was present in Severe-Death patients and missing from mild and Severe-Recovered patients (Figure 7).

Mild solid tumors patients showed a complex network characterized by positive correlations between anti-SARS-CoV-2 antibodies, with IgG and IgA correlating strongly with IL-7, IL-9, IL-4 and platelet counts. In addition, they showed positive networks between anti-inflammatory factors (IL-1RN) and inflammatory factors (IFN- γ , IL-17A, CCL3, and IL-6), suggesting a coregulation of the inflammatory response (Figure 7A). Moreover, among Severe-Recovered patients, IL-4, IL-12A, IL-15 and IL-17A formed strong positively correlated interactions with one another. IL-4 correlated with other T_H2 factors, such as CCL11 and IL-9, whereas FGF2 also correlated with T_H1 factors, such as IL-15, IL-12A, and IL-7 (Figure 7B). Furthermore, Severe-Recovered patients presented positive correlations specifically between IL-10, IL-17A and TNF, indicating an important regulatory axis. Overall, these findings

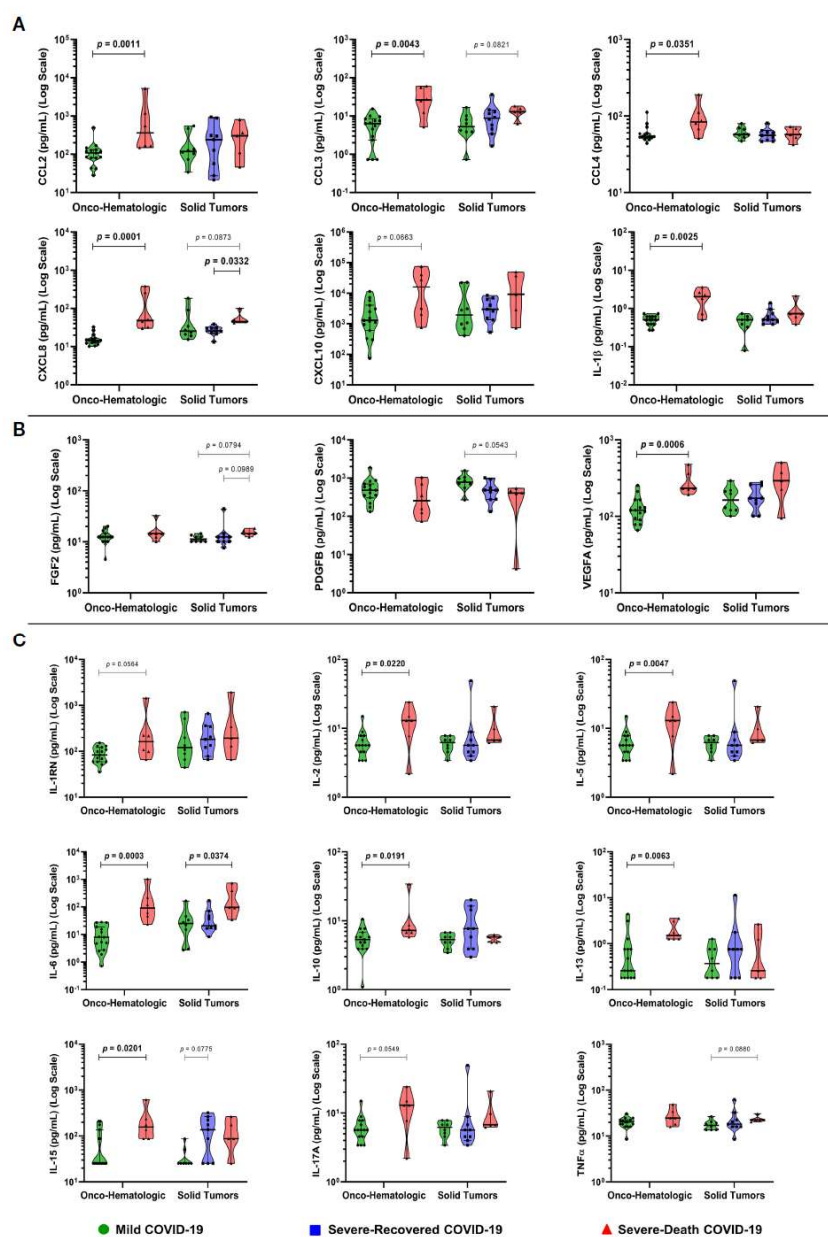


FIGURE 3

Patients with hematologic malignancies and COVID-19 that display an exacerbated soluble immune profile develop severe disease culminating in death. Blood samples were collected within two days (median; 1 – 4 CI) of the positive SARS-CoV-2 diagnostic and analyzed for 27 immune mediators, being them recruitment factors (A), growth factors (B), and cytokines (C). Groups were defined based on disease severity, as Mild (green), Severe-Recovered (blue), or Severe-Death (red), as described. Data is presented as median plus 95% confidence intervals and was analyzed with Kruskal-Wallis adjusted for multiple comparisons followed by Dunn's *post-hoc* test or Mann-Whitney test. All exact *p*-values below 0.1 are shown. IL-1RN, Interleukin 1 Receptor Antagonist. N = 21 for Onco-hematologic and N = 22 for Solid Tumors group.

point to an active complex immunoregulatory network indicative of a balanced type I immune response in solid tumors patients that had mild COVID-19, whereas patients that recovered from severe disease presented an immune profile indicative of mixed type I and type II responses (Figures 7A, B).

In stark contrast, solid tumor patients that went on to die showed fewer interactions (Figure 7C and Supplementary Figure 4B), characterized by a node composed of CXCL8, D-dimer and monocytes, as well as an IL-15 axis characterized by both strong positive and negative correlations. Most interactions between IgG, IgM or IgA antibodies were lost in comparison

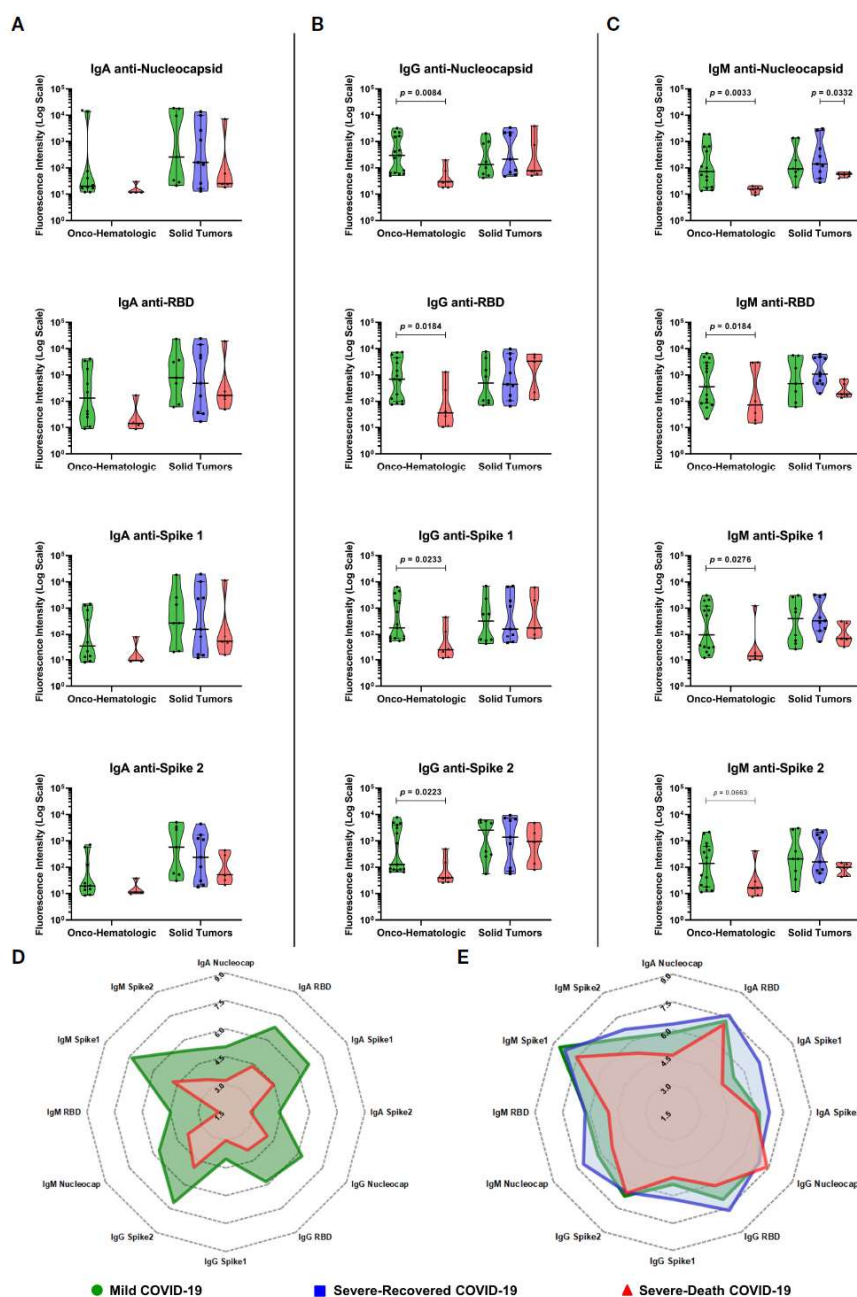


FIGURE 4

COVID-19 positive patients with hematologic malignancies that develop severe disease culminating in death display decreased IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies before disease progression. Blood samples were collected within two days (median; 1–4 CI) of the positive SARS-CoV-2 diagnostic and analyzed for Immunoglobulins IgA (A), IgG (B) and IgM (C) anti-SARS-CoV-2 proteins as described in Materials and Methods. Radar charts for Onco-hematologic (D) or Solid Tumors (E) patients show the mean values for each factor after fluorescence intensity data was normalized by $\ln(x+1)$. Groups were defined based on disease severity, as Mild (green), Severe-Recovered (blue), or Severe-Death (red), as described. Data is presented as median plus 95% confidence intervals and was analyzed with Kruskal-Wallis adjusted for multiple comparisons followed by Dunn's *post-hoc* test or Mann-Whitney test. All exact *p*-values below 0.1 are shown. Nucleocapsid, RBD, Spike 1 and Spike 2 labels refers to IgG antibodies anti-SARS-CoV-2 proteins. RBD, Receptor Binding Domain. $N = 21$ for Onco-hematologic and $N = 22$ for Solid Tumors group (IgG and IgM measurements) and $N = 14$ for Onco-hematologic and $N = 21$ for Solid Tumors group (IgA measurements).

with solid tumor patients that progressed to better outcomes. Moreover, almost all interactions between IgA and IgM anti-SARS-CoV-2 proteins and other factors were negative, suggesting that increased immune activity was detrimental to

antibody production in those patients (Figure 7). Lastly, the overall strength of the correlations between factors within the Severe-Death group was stronger than that in the Mild and Severe-Recovered groups (Supplementary Figure 4B).

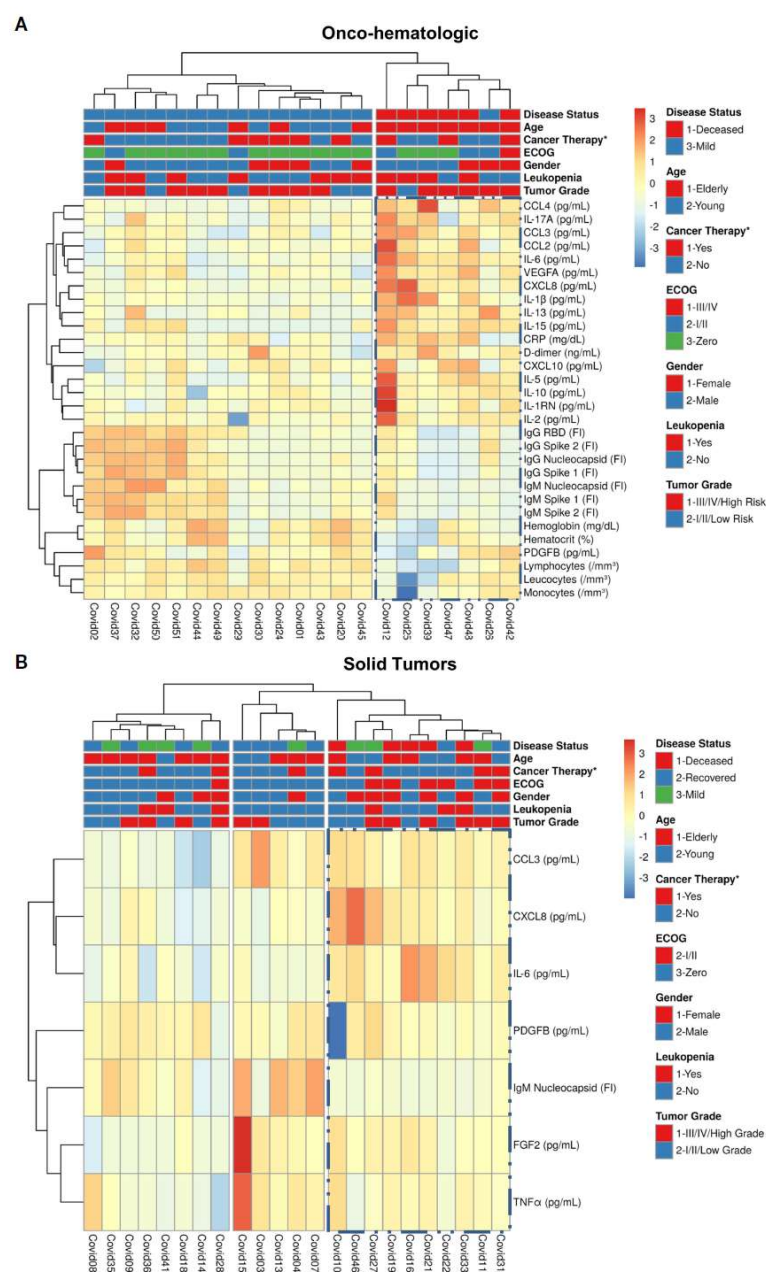


FIGURE 5

High levels of immune mediators, low IgG anti-SARS-CoV-2, and low leukocyte subpopulations segregate Severe-Death patients with hematologic malignancies from those with Mild disease outcomes. Blood samples were collected within two days (median; 1 – 4 CI) of the positive SARS-CoV-2 diagnostic and analyzed for 27 immune mediators and for immunoglobulins anti-SARS-CoV-2 proteins, as described in Materials and Methods. Groups of hematologic cancer patients (A) and solid tumors patients (B) were defined based on disease severity as described. All data was normalized by natural logarithm + 1 [$\ln(x + 1)$] before running an unsupervised cluster analysis and generation of the heatmap using ClustVis platform as described in Materials and Methods. In (A) both rows and columns were clustered by Manhattan distance and Complete linkage. In (B) both rows and columns were clustered by Euclidean distance and Ward linkage. Nucleocapsid, RBD, Spike 1 and Spike 2 labels refers to antibodies anti-SARS-CoV-2 proteins. CRP, C-Reactive Protein; RBD, Receptor Binding Domain. *Refers to active cancer therapy one month prior to COVID-19 diagnosis.

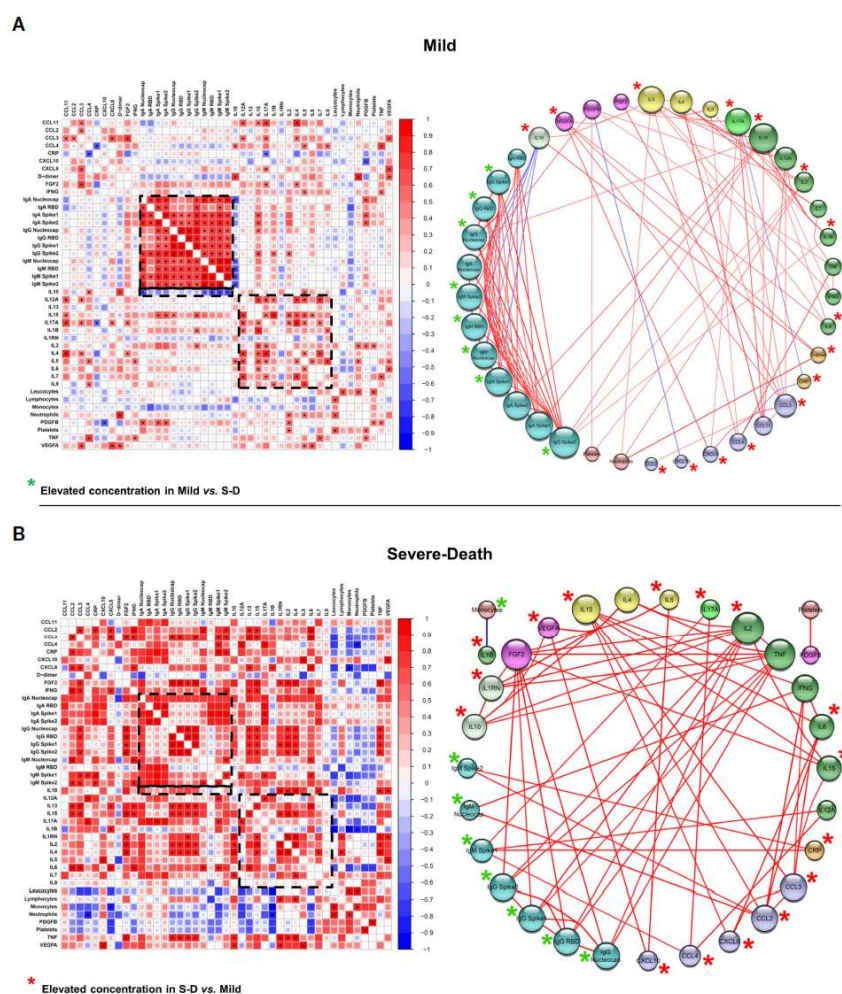


FIGURE 6

Correlation networks suggest that immune hyperactivation and an impaired antibody response are correlated with death outcome in patients with hematologic malignancies. Data from electronic health records, 27-Plex assay and anti-SARS-CoV-2 proteins' antibodies assays was used to construct a Spearman's correlation matrix with all statistically significant ($p < 0.05$, highlighted as *) Spearman's Rho values, ranging from -1 to 1. The matrix was then used to construct the correlation networks. Red lines connecting the spheres represent positive correlations, whereas line thickness and hotter colors represent correlations with Rho closer to 1. Blue lines connecting the spheres represent negative correlations, whereas line thickness and colder colors represent correlations with Rho closer to -1. Spheres' sizes correlate with the number of interactions for each factor, whereas the bigger radius represents factors with more interactions. Spheres' colors represent factors that have similar activities, characteristics or functions. Disease groups were defined as Mild (A; $n = 15$) and Severe-Death (B; $n = 6$), as described. Nucleocapsid, RBD, Spike 1 and Spike 2 labels refers to antibodies anti-SARS-CoV-2 proteins. Monocytes, Neutrophils and Platelets refers to blood counts per mm^3 of blood. CRP, C-Reactive Protein; FGF2, Fibroblast Growth Factor 2; IL-1RN, Interleukin 1 Receptor Antagonist; RBD, Receptor Binding Domain.

Cytokine levels in early stages of disease act as predictive markers for COVID-19 severity

To investigate the predictive power of soluble immune factors for identifying patients that will go on to severe disease and death (Severe-Death group) vs. those that will recover (Mild and Severe-Recovered groups), we performed a random forest analysis, followed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis.

As expected, forest plots showed that patients with hematologic neoplasms had many more segregating factors in comparison with solid tumor patients (Figures 8A, B). While CXCL8 and IL-6 were the most important factors that segregated Severe-Death solid tumors patients, CXCL8, CRP and IL-6 had important roles for segregation of patients with hematologic cancers (Figures 8A, B). Interestingly, for both groups antibodies were important factors for segregating patients that had better outcomes, whereas inflammatory factors were important for segregating individuals that went on to die (Figures 8A, B).

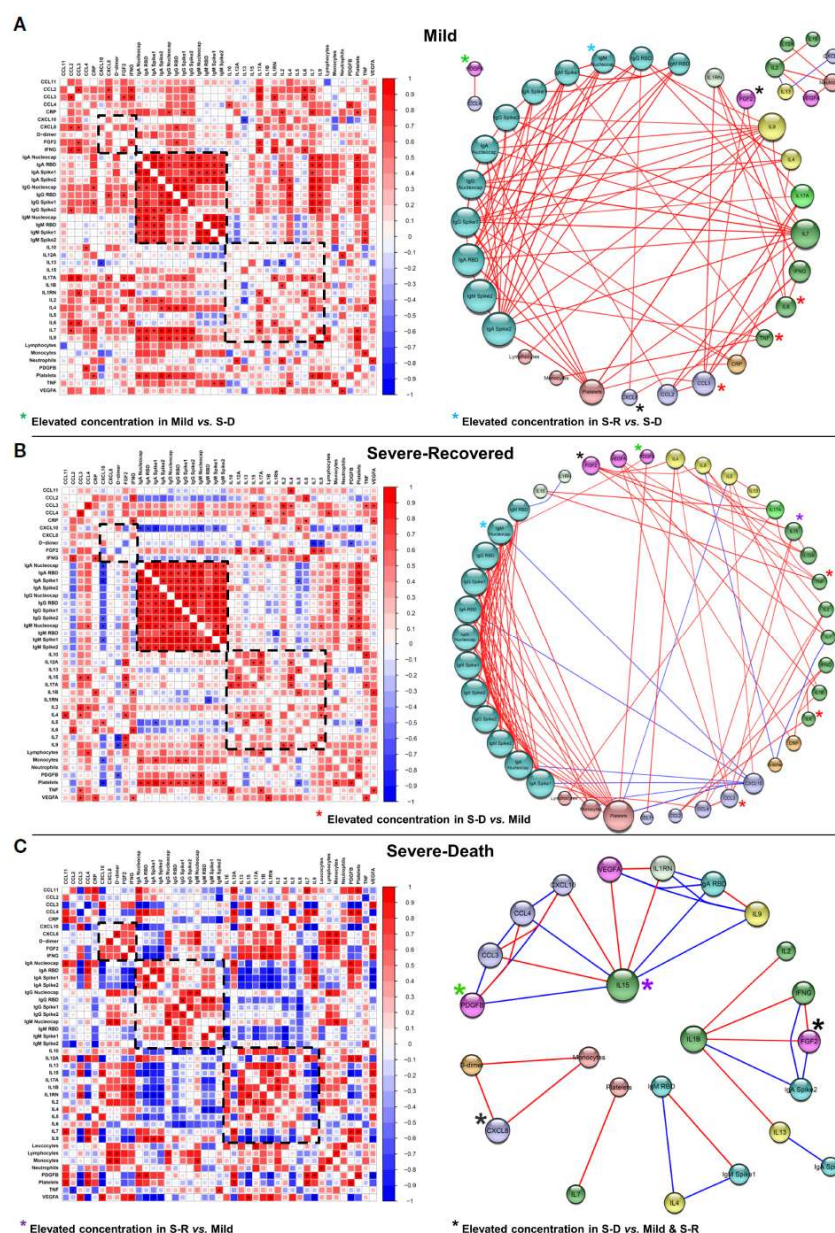


FIGURE 7

Correlation networks suggest lack of immune regulation and loss of coordinated antibody production in patients with solid tumors that went on to die from COVID-19. Data from electronic health records, 27-Plex assay and anti-SARS-CoV-2 proteins' antibodies assays was used to construct a Spearman's correlation matrix with all statistically significant ($p < 0.05$, highlighted as *) Spearman's Rho values, ranging from -1 to 1. The matrix was then used to construct the correlation networks. Red lines connecting the spheres represent positive correlations, whereas line thickness and hotter colors represent correlations with Rho closer to 1. Blue lines connecting the spheres represent negative correlations, whereas line thickness and colder colors represent correlations with Rho closer to -1. Spheres' sizes correlate with the number of interactions for each factor, whereas the bigger radius represents factors with more interactions. Spheres' colors represent factors that have similar activities, characteristics or functions. Disease groups were defined as Mild (A; $n = 8$), Severe-Recovered (B; $n = 9$) and Severe-Death (C; $n = 5$), as described. Nucleocapsid, RBD, Spike 1 and Spike 2 labels refers to antibodies anti-SARS-CoV-2 proteins. Lymphocytes, Monocytes, Neutrophils and Platelets refers to blood counts per mm^3 of blood. CRP, C-Reactive Protein; FGF2, Fibroblast Growth Factor 2; IL-1RN, Interleukin 1 Receptor Antagonist; RBD, Receptor Binding Domain.

Next, we performed predictive analysis using ROC curves with the top hits identified from the random forest analysis and identified factors that resulted in the highest AUC with clear cutoff values. We also plotted curves in an X by Y graph

considering how the immune mediator concentration would influence the probability of death of an individual. Then we applied a Grompertz Growth model, which was the best to explain the data distribution (Figures 8C–E). We observed that

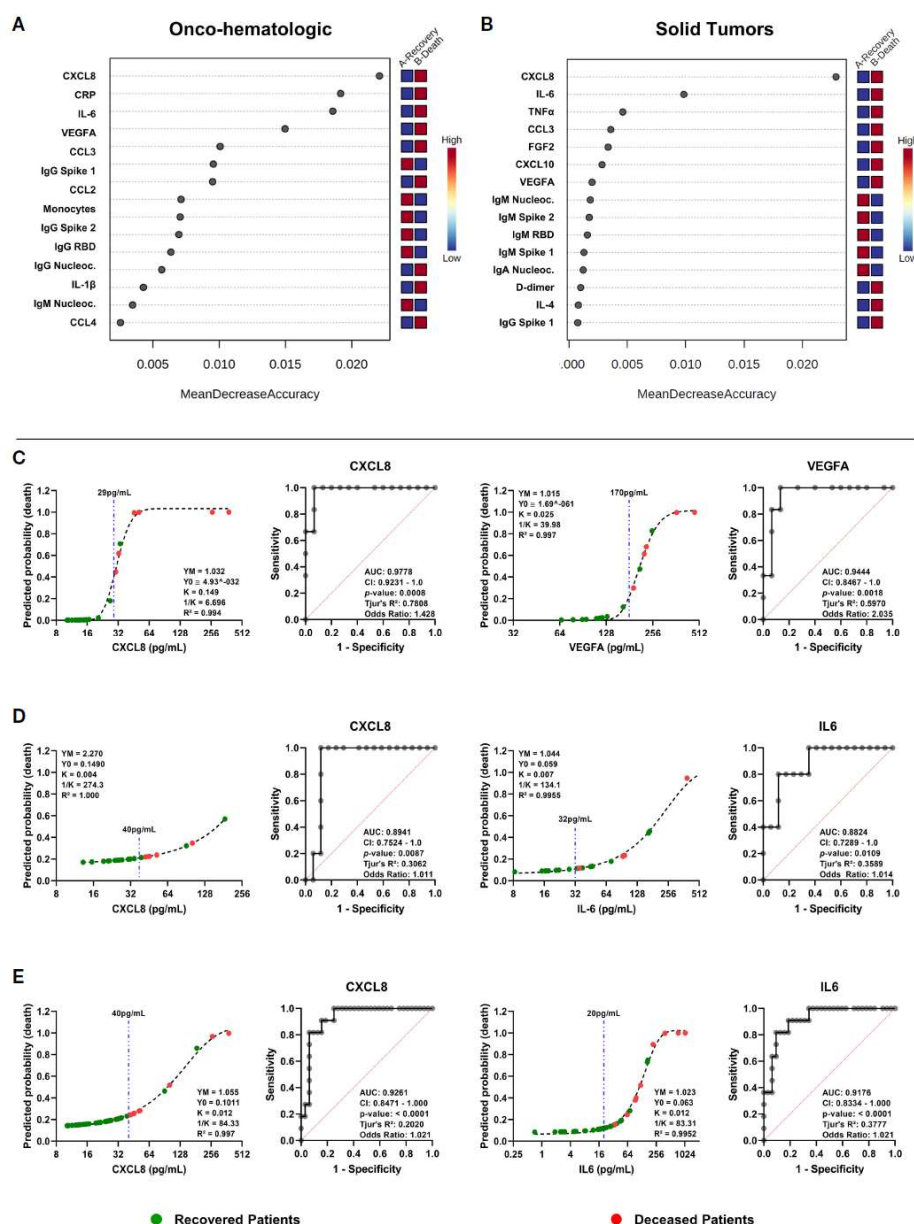


FIGURE 8

Random forests classification and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis indicates CXCL8 as a predictor of death for oncologic patients infected by SARS-CoV-2. Data from electronic health records, 27-Plex assay and anti-SARS-CoV-2 proteins' antibodies assays was used as a base for random forests classification analysis (A, B) or ROC curves construction (C–E). Graphs in (A) and (B) show the importance of each factor to segregate outcomes of hematologic cancer patients (A, C) or solid tumors patients (B, D). ROC curves show area under the curve (AUC), 95% confidence interval of the AUC, *p*-value, Tjur's pseudo *R*² and odds ratio for hematologic cancer patients (C), solid tumors patients (D), or both (E). Related line charts show predicted probability of death, *R*², and variables for the Gompertz Growth model. Dashed blue lines indicate proposed cutoffs in pg/mL. For both groups the outcomes were defined as recovery (indicating all patients that survived) versus death (all patients that went on to die). In (A, C), *n* = 15 for "Recovery" and *n* = 6 for "Death"; In (B, D), *n* = 17 for "Recovery" and *n* = 5 for "Death". In (E), *n* = 22 for "Recovery" and *n* = 11 for "Death". Nucleocapsid, RBD, Spike 1 and Spike 2 labels refers to antibodies anti-SARS-CoV-2 proteins. CRP, C-Reactive Protein; RBD, Receptor Binding Domain.

CXCL8 (AUC 0.98) and VEGFA (AUC 0.94) were particularly good at predicting COVID-19 outcomes within hematologic cancer patients (Figure 8C), while CXCL8 (AUC 0.89) and IL-6 (AUC 0.88) were good predictors for solid tumor patients

(Figure 8D). Finally, we identified both CXCL8 (AUC 0.93) and IL-6 (AUC 0.92) as excellent predictors of death for oncologic patients in general, regardless of whether they had hematologic or solid tumors (Figure 8E).

Discussion

Our data shows that hematologic and solid tumor cancer patients display distinct systemic immune, hematological and biochemical indicators of disease following infection with SARS-CoV-2, and that these characteristics are capable of segregating patients based on disease outcome (Figure 9).

First, among blood and biochemical measurements, the hematologic cancer cohort displayed increased CRP and D-dimer concentrations and lower hematocrit and hemoglobin levels in patients that progressed to death (Severe-Death group) (Figures 2B, C). Although D-dimer evaluation, leukopenia and lymphopenia are useful markers indicative of COVID-19 severity in the general population (15, 16), only the hematologic cancer cohort displayed significant differences in D-dimer concentrations, and lymphocytes and monocyte counts (Figures 2A, C). However, it is of note that solid tumor COVID-19 patients may also suffer a reduction in specific populations of T cells (17) throughout the disease.

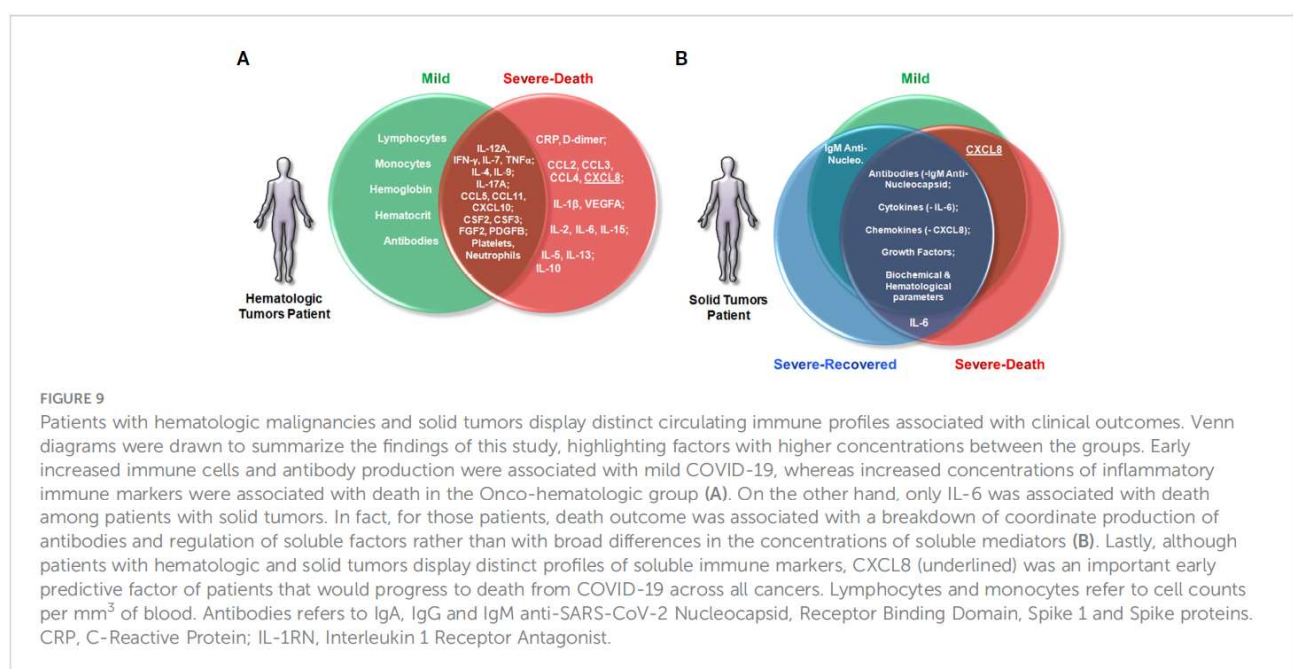
Regarding the systemic soluble immune molecules, the analysis revealed distinct immune networks between hematologic and solid tumor cancer patients, however, both groups displayed elevated concentrations of IL-6 and CXCL8 among individuals that progressed to death (Figure 3 and 5). The two factors are associated with cytokine-release syndrome and COVID-19 severity (12, 17, 18), and have roles in inflammation, myeloid cell recruitment and tissue damage (19). In our study, they were good early indicators of death risk (Figure 8).

Among patients with solid tumors, the analysis also showed a trend to increased concentrations of IL-15 in plasma of

patients that recovered from the disease compared with patients who only presented mild COVID-19. This increased concentration was significant in patients with hematologic malignancies that would die from COVID-19 compared to individuals that would present only the mild form of the disease (Figure 3C). Given that NK cells participate in antiviral responses, and that IL-15 is a cytokine with an important role in the proliferation and biology of NK cells (20), it is of interest to determine the role of these cells as inflammatory drivers or infection-resolving agents.

Furthermore, Severe-Death hematologic cancer patients showed a trend to increased production of IL-17A, similar to what is observed in individuals from the general population infected by SARS-CoV-2 and other SARS viruses (21). The Severe-Death hematologic cancer group also had elevated concentrations of IL-5 and IL-13 (Figure 3C). These factors are associated with eosinophil activation, airway complications, pulmonary diseases, and COVID-19 severity (18, 19, 21), but their exact role in COVID-19 progression or resolution is not well understood.

We also observed increased concentrations of CCL2, CCL3, CCL4, VEGFA and IL-1 β in Severe-Death hematologic cancer patients (Figures 3 and 5A). These factors are important for recruitment of myeloid cells, induction of fever and inflammation (22), and development and restructuring of blood vessels (23). VEGFA specifically is associated with virus spread (24), hypoxia, and tissue-related damage during COVID-19 (25). Overall, patients with hematologic malignancies seem to suffer from exacerbated immune responses, possibly related to the lack of leukocyte subpopulations during the initial phases of



infection, since leukopenia is associated with death and the presence of CD8⁺ T Cells with survival (10, 26). Nevertheless, this hypothesis in the oncologic context still needs further investigation.

We also found a striking decrease in the plasma levels of IgG and IgM anti-SARS-CoV-2 proteins in Severe-Death hematologic patients, which was not seen in Severe-Death solid tumor patients (Figure 4). While antibody titers may vary over the two weeks following the onset of COVID-19 symptoms (27), our findings show that initial antibody levels shortly after diagnosis among hematologic cancer patients indicate possible individuals that would have mild disease, or progress to death (Figures 4 and 5A), which was also shown in patients from the general population (28).

This lack of effective antibody-based responses among hematologic cancer patients may be associated with myeloma (29), weak T cell responses (30, 31), and oncologic treatments (32). In the COVID-19 context data on this topic is scarce and outcomes are dependent on the type of tumor, treatments, treatment timings, and individual factors (13). The few publications regarding the immune response of patients with cancer against SARS-CoV-2 infections shed light on how chemotherapy, stem cell transplant, and anti-CD20 therapies negatively impact antibody production (33, 34). Nevertheless, we could not observe a clear bias in hematologic malignancy type or cancer treatment in production of antibodies or in the outcome of COVID-19 among our patients (Figure 5, Table 1).

Regarding the multiple correlation analysis, patients with hematologic malignancies that presented only mild disease had extensive networks between a number of immune factors and antibodies, also involving cytokines associated with type I, II and III immune responses (Figures 6A, B; Supplementary Figure 4A). We observed prominent roles for type I associated factors, such as IL-2, IL-7, IL-12A, IL-15, and antibodies in general (Figure 6A), which are known for their importance for combating SARS-CoV-2 infection (25, 35, 36). We also observed a possible regulatory axis for type II responses composed of IL-4, IL-5, and IL-10, and an interesting interaction between IL-17A, CCL4 and CRP (Figure 6A). Although C-reactive protein is well known for its association with inflammation, it is important to note that this factor also display regulatory properties (37).

Regarding Severe-Death hematologic cancer patients, we observed a chemokine axis involving CCL2, CCL3, CXCL8 and IL-6, and an inverse correlation between IL-1 β and monocytes (Figure 7C), indicating that those patients displayed an exacerbated inflammatory response as compared to patients that recovered from COVID-19. We also observed strong correlations involving IL-2, TNF-alpha and immunoglobulins, pointing to an immune response skewed toward myeloid-derived cells, which could further exacerbate the pathological process (25, 38). Supporting this possibility are previous findings indicating that high levels of TNF-alpha and IL-6 correlate negatively with T

cell numbers in severe COVID-19 in the general population (30), and that B cell numbers and antibodies are reduced in COVID-19 patients with hematologic malignancies (17). Taken together these results suggest that the lack of a balanced and effective type I lymphocyte-based response, together with an exacerbated inflammatory response, are critical factors leading to death among patients with hematologic malignancies.

On the other hand, network analysis of soluble factors from patients with solid tumors showed that in mild disease IL-1RN forms a potential immunoregulatory network (Figure 7A). IL-1RN is seen in severe COVID-19 patients from the general population (18), and may have a role counterbalancing inflammatory activity (22) in patients with mild disease. Contrary to what was observed in patients with better outcomes, the Severe-Death group was marked by a negative correlation between IL-4 levels and IgM anti-SARS-CoV-2 proteins (Figure 7C). In addition, the Mild group displayed a strong correlation between anti-SARS-CoV-2 antibodies, IL-7, and IL-9 that was not seen in the severe disease groups (Figure 7). Interestingly, IL-9 shares the γ -chain receptor with other lymphocyte-proliferation cytokines, such as IL-2, IL-4 and IL-7, and aside from its effects on promoting allergic inflammation, IL-9 can also influence the effector activities of T and B lymphocytes, even enhancing the production of IgE and IgG from human cells (39, 40). Conversely, the Severe-Death group was marked by a strong positive correlation between CXCL8, D-dimer and monocytes (Figure 7C), factors associated with COVID-19 severity among the general population (7, 25, 41, 42), and in solid tumor patients specifically (17). Lastly, we also observed in the Severe-Death group an IL-15-based axis characterized by both strong positive and negative correlations with several immune mediators (Figure 7C), which highlights the need of a thorough investigation about the role of IL-15 in patients with cancer and COVID-19, given that exhausted T and NK cell populations are observed throughout the disease (17, 28, 35).

Finally, our predictive analysis showed distinctive roles for VEGFA, CXCL8, and IL-6 in segregation of patients by outcome (Figure 8). None of these factors – with the exception of IL-6 – were important predictors of mortality in studies with large numbers of markers regarding COVID-19 in the general population (18, 43). Therefore, our findings support the need of further studies to validate the use of these factors as potential clinically useful biomarkers.

However, this work has some limitations worth highlighting. The first factor is that cancer itself is a disease with broad manifestations, influenced by several factors, many of which cannot be controlled in a real-life setting. Therefore, we recognize that our cohorts are heterogeneous and that each type of cancer can influence the immune response in particular ways. The second is that cancer therapies also may affect the immune response in particular ways, a situation that depends on

several individual factors, one of which is the type of cancer itself. The last is the limited number of patients – a fact present in other studies regarding cancer and COVID-19 (17, 26, 33), and the very specific population (from a Cancer Center in Brazil with acute COVID-19 patients that were all naïve to SARS-CoV-2 vaccines). Importantly, despite these complexities, we identified immune molecules and networks associated with COVID-19 clinical outcome among our cancer patient cohorts.

To the best of our knowledge, this is the first immune-focused study comparing distinct COVID-19 outcomes in patients with cancer. Our results indicate important differences in immune responses in solid tumor and hematologic cancer individuals with COVID-19, suggesting that inflammation based on myeloid-derived cells in early phases of infection could be detrimental for the onset of severe disease and death, as indicated by other studies (25, 41, 42). Given that CXCL8 was an important predictive factor of disease outcome in oncologic patients, it will be interesting to assess if this finding is also observed in other cohorts, and how a therapeutic approach reducing neutrophil-based inflammation could help patients infected by SARS-CoV-2. In addition, investigating specific immune cell populations present in the blood could also help in understanding the different COVID-19 outcomes observed in oncologic patients, especially those with hematologic malignancies.

Materials and methods

Patient enrolment and classification

From May to November 2020, we included 43 oncologic patients with a recent diagnostic of SARS-CoV-2 from A.C.Camargo Cancer Center (Table 1). All volunteer patients received information about the project and gave written consent to participate before initiation of any procedure regarding this work. Individuals were segregated by solid tumors or hematological malignancies based on their previous diagnostic. If the individual had a history of both solid and hematologic tumors, the group selection was based on the most recent or active cancer. Severity of COVID-19 was determined based on the World Health Organization's proposed recommendations (44), as follows: Mild, no oxygen therapy; Severe-Recovered, for patients who had oxygen therapy, but recovered from the disease; and Severe-Death, for patients who had oxygen therapy and went on to die from COVID-19. For patients that received supplemental O₂, we considered a minimum of two days of therapy. All patients that received supplemental O₂ therapy also received dexamethasone treatment as recommended by the RECOVERY Collaborative Group study (45). The project was approved by A.C.Camargo Cancer Center Ethics Committee (CAE:30283220.5.0000.5432).

SARS-CoV-2 infection assessment

Patients were assessed for infection by SARS-CoV-2 using a real-time qPCR test whenever they presented symptoms for the disease (cough, dyspnea, loss of smell and/or taste, fever) or otherwise indicated by the clinical teams.

Electronic health records assessment

Biochemical evaluation (C-Reactive Protein and D-dimer concentrations), hematological data (leukocyte, lymphocyte, monocyte, neutrophil, and platelet counts, hemoglobin concentration and hematocrit), tumor classification, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status scale score, treatment, and other relevant information were obtained from health records available for each patient.

Blood sampling and processing

Blood samples were collected in EDTA tubes within a median of two days (95% CI: 1 – 4 days) from positive SARS-CoV-2 test result. Blood was centrifuged at 400xg, 10 minutes, 20°C for collection of plasma, which was then snap frozen in dry ice and stored at -80°C until further processing.

Quantification of plasma soluble mediators

Concentration of plasma soluble factors were determined using a 27 multiplex bead assay (Bio-Plex[®] Pro Human Cytokine Group I Panel 27-plex, Bio-Rad Inc., USA). Multiplex bead assays (Bio-Plex[®] Pro Human IgA/IgG/IgM SARS-CoV-2 N/RBD/S1/S2 4-Plex Panel, Bio-Rad Inc., USA; provided as three separate kits) were used to measure production of IgA, IgG and IgM antibodies anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid, Receptor Binding Domain (RBD), Spike 1 and Spike 2 proteins. Virus inactivation was performed through incubation at 56°C/30 minutes before analyte quantification. All procedures were done accordingly to the manufacturer's instructions, and plates were read in Bio-Plex platform (Bio-Plex[®] 200 system, Bio-Rad Inc., USA). All data is presented as pg/mL, based on standard curves provided by the kit (27-Plex), or as fluorescence intensity (4-Plex antibodies assays).

Statistical analysis

All soluble factors and hematological data were analyzed in Graph Pad Prism 8.4.2 for construction of Receiver Operator

Characteristic (ROC) curves, line plots and scatter dot plots. For scatter dot plots, data from patients with hematologic malignancies was analyzed with a two-tailed Mann-Whitney test, whereas solid tumors patient data was analyzed with a two-tailed Kruskal-Wallis adjusted test followed by Dunn's *post-hoc*. Data is presented as median and 95% confidence interval.

ROC curves were constructed using the multiple logistic regression model $\text{Logit}[P(Y=1)] = \text{Ln}[(P(Y=1)/P(Y=0))] = \beta_0 + \beta_1 \cdot B$. Related line charts show data points indicating how analyte concentration influences the probability of death of an individual, calculated based on the model aforementioned. A fitting line was drawn based on the Gompertz Growth Model given in Graph Pad Prism software, with the following equation: $Y = Y_M \cdot (Y_0/Y_M)^{(\exp(-K \cdot X))}$, where Y_0 is the starting population, Y_M is the maximum population, K determines the lag time and $1/K$ is the X value of inflection point.

For radar charts, raw data (fluorescence intensity) from 4-Plex antibodies assays, including values from the positive controls, were transformed by $\text{Ln}(X+1) \cdot 10$. Then each measurement of antibody production for each patient was divided by the positive control value of that class of antibody. This way we could correct distinct measurements for different classes of antibodies and all measurements fit inside a scale from 1 to 10. The graphs were constructed in Microsoft Office Excel 2010.

Unsupervised cluster analysis was performed using the online tool ClustVis (46). Raw data from all parameters or parameters with a p -value below 0.10 were uploaded in ClustVis platform and transformed with $[\text{Ln}(x+1)]$ model. The analysis was performed using a hierarchical cluster algorithm where rows and columns were clustered by Manhattan or Euclidean distance and Ward or Complete linkage. Missing data (< 2% of total data) was estimated by imputation as per default.

Correlation matrices were done in R software version 4.0.0 and R Studio 1.4.1106, with *corrplot* and *Hmisc* packages. Briefly, raw data from each patient for each group in both cohorts was organized into a data frame, and a Spearman correlation test was run. All Spearman's coefficients are shown in the matrices, but a star indicates correlations with a p -value of 0.05 or below.

Networks were constructed using the Cytoscape software version 3.8.2. Data from correlation matrices was used to make the networks, considering only interactions with a p -value below 0.05. Line thickness and colors refers to strength and value of the interaction, while sphere radius reflects the number of interactions.

For random forests analysis, raw data was uploaded in MetaboAnalyst 5.0 platform (<https://www.metaboanalyst.ca>) and missing values (< 2% of total data) were estimated by Bayesian Principal Component Analysis. Forest plots were

made randomly with 500 trees and 7 predictors to determine the most important factors for segregation accuracy based on outcomes, which were "Recovery" – for all patients that survived; or "Death" – for all patients that died.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by A.C.Carmaro Cancer Center Ethics Committee (CAE:30283220.5.0000.5432). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

KG and MB conceptualized and designed the study. Data collection was performed by FP-O, AF, NG and KM. Data analysis and interpretation was performed by FP-O, AF, NG, WD, MB and KG. The article was drafted by FP-O, AF, WD and KG. Critical revision of the article was performed by all authors. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was funded by FAPESP (#2020/16736-0), NIH-NCI/CNPq Brazil cooperative grant (5R01CA246368-02) and a NIVEA donation to A.C.Camargo Cancer Center. KJG and WOD are CNPq research fellows. FAPESP, CAPES and CNPq provided post-graduate fellowships. We would like to acknowledge the critical contribution of nurses and laboratory technicians in patient recruitment, care, sample collection and processing: Amanda França de Nóbrega, Amanda Stephanie Sousa, Bruna Tirapelli Gonçalves, Cassia da Silva, Fernanda Araújo Pintor, Iara Monique Messias, Lais Corsino Durant, Laís Lie Senda de Abrantes, Luciana Facure Moredó, Juliana de Oliveira Souza, Vanessa da Silva Alves, Rodrigo Reghini da Silva, Ana Paula Mitsue, Bruna Barros, Clara Maciel Cavalcanti, Gabriela Branco, Eloísa Ribeiro Olivieri, Katia Klug Oliveira, and Louise de Carvalho Mota. We also recognize the contribution of patient volunteers.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1052104/full#supplementary-material>

References

- Hu B. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* (2020) 19:141–54. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7
- Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, et al. Coronavirus disease 2019 - COVID19. *Clin Microbiol Rev* (2020) 33(4):1–48. doi: 10.1128/CMR.00028-20
- De Souza WM, Buss LF, Candido S, Carrera J, Li S, Zarebski AE, et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. *Nat Hum Behav [Internet]* (2020) 4:856–65. doi: 10.1038/s41562-020-0928-4
- Zeiser FA, Donida B, da Costa CA, Ramos G de O, Scherer JN, Barcellos NT, et al. First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. *Lancet Reg Heal - Am* (2022). doi: 10.1016/j.lana.2021.100107
- Brazilian Ministry of health - DATASUS. *painel coronavirus [Internet]* (2022). Available at: <https://covid.saude.gov.br/>.
- Croda J, Oliveira WKde, Frutuoso RL, Mandetta LH, Baia-Da-silva DC, Brito-Sousa JD, et al. Covid-19 in Brazil: Advantages of a socialized unified health system and preparation to contain cases. *Rev Soc Bras Med Trop* (2020) 53:2–7. doi: 10.1590/0037-8682-0167-2020
- Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:355–62. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4
- Lee LYW, Cazier JB, Starkey T, Briggs SEW, Arnold R, Bisht V, et al. COVID-19 prevalence and mortality in patients with cancer and the effect of primary tumour subtype and patient demographics: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* (2020) 21(10):1309–16. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30442-3
- Robilotti EV, Babady NE, Mead PA, Rolling T, Perez-Johnston R, Bernardes M, et al. Determinants of COVID-19 disease severity in patients with cancer. *Nat Med [Internet]* (2020) 26:1218–23. doi: 10.1038/s41591-020-0979-0
- Derosa L, Melenotte C, Griscelli F, Gachot B, Marabelle A, Kroemer G, et al. The immuno-oncological challenge of COVID-19. *Nat Cancer* (2020) 1:946–64. doi: 10.1038/s43018-020-00122-3
- Chamilos G, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Are all patients with cancer at heightened risk for severe coronavirus disease 2019 (COVID-19)? *Clin Infect Dis* (2020) 72(2):351–6. doi: 10.1093/cid/ciaa1079
- Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med [Internet]*. (2021) 27(1):28–33. doi: 10.1038/s41591-020-01202-8
- Fernandes GA, Feriani D, França e Silva ILA, Mendonça e Silva DR, Arantes PE, Canteras J da S, et al. Differences in mortality of cancer patients with COVID-19 in a Brazilian cancer center. *Semin Oncol [Internet]*. (2021) 48(2):171–80. doi: 10.1053/j.seminoncol.2021.01.003
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet [Internet]*. (2020) 395(10229):1033–4. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0
- Pereira MAM, de Almeida Barros IC, Jacob ALV, de Assis ML, Kanaan S, Kang HC. Laboratory findings in SARS-CoV-2 infections: State of the art. *Rev Assoc Med Bras* (2020) 66(8):1152–6. doi: 10.1590/1806-9282.66.8.1152
- Terpos E, Ntanas-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastiris E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol* (2020) 95(7):834–47. doi: 10.1002/ajh.25829
- Abdul-Jawad S, Baù L, Alaguthurai T, del Molino del Barrio I, Laing AG, Hayday TS, et al. Acute immune signatures and their legacies in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 infected cancer patients. *Cancer Cell* (2021) 39(2):257–275.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2021.01.001
- Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. (2020) 584(7821):463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
- Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics*. (2017) 7(6):1543–88. doi: 10.7150/thno.15625
- Carson BWE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* (1994) 180(4):1395–403. doi: 10.1084/jem.180.4.1395
- Schett G, Manger B, Simon D, Caporali R. COVID-19 revisiting inflammatory pathways of arthritis. *Nat Rev Rheumatol [Internet]* (2020) 16:465–70. doi: 10.1038/s41584-020-0451-z
- Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* (2018) 281(1):8–27. doi: 10.1111/imr.12621
- Presta M, Andrés G, Leali D, Dell'Era P, Ronca R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. *Eur Cytokine Netw* (2009) 20(2):39–50. doi: 10.1684/ecn.2009.0155
- Polidoro RB, Hagan RS, Santiago RDS, Schmidt NW. Overview: Systemic inflammatory response derived from lung injury caused by SARS-CoV-2 infection explains severe outcomes in. *Front Immunol* (2020) 11:1626. doi: 10.3389/fimmu.2020.01626
- Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol* (2020) 38:970–9. doi: 10.1038/s41587-020-0602-4
- Bange EM, Han NA, Wileyto P, Kim JY, Gouma S, Robinson J, et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat Med [Internet]*. (2021) 27(7):1280–9. doi: 10.1038/s41591-021-01386-7
- Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol* (2021) 5(54):1–20. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0240
- Silva J, Lucas C, Sundaram M, Israelow B, Wong P, Klein J, et al. Saliva viral load is a dynamic unifying correlate of COVID-19 severity and mortality. *medRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.01.04.21249236
- Jackson DA, ElSawa SF. Factors regulating immunoglobulin production by normal and disease-associated plasma cells. *Biomolecules*. (2015) 5(1):20–40. doi: 10.3390/biom5010020
- Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* (2020) 11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827
- Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell [Internet]*. (2020) 181(7):1489–1501.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.015
- Mehta RS, Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence [Internet]*. (2016) 7(8):901–16. doi: 10.1080/21505594.2016.1208866

33. Esperança-Martins M, Gonçalves L, Soares-Pinho I, Gomes A, Serrano M, Blankenhaus B, et al. Humoral immune response of SARS-CoV-2-infected patients with cancer: Influencing factors and mechanisms. *Oncologist [Internet]*. (2021) 26(9):e1619–32. doi: 10.1002/onco.13828
34. Thakkar A, Gonzalez-Lugo JD, Goradia N, Gali R, Shapiro LC, Pradhan K, et al. Seroconversion rates following COVID-19 vaccination among patients with cancer. *Cancer Cell [Internet]*. (2021) 39(8):1081–1090.e2. doi: 10.1016/j.cccell.2021.06.002
35. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Breillat P, Carlier N, et al. Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe covid-19 patients. *Scient* (2020) 369(6504):718–24. doi: 10.1101/2020.04.19.20068015
36. Meffre E, Iwasaki A. Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature*. (2020) 587(7834):374–6. doi: 10.1038/d41586-020-03070-1
37. Black S, Kushner I, Samols d. C-reactive protein. *J Biol Chem [Internet]*. (2004) 279(47):48487–90. doi: 10.1074/jbc.R400025200
38. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* (2017) 39(5):529–39. doi: 10.1007/s00281-017-0629-x
39. Goswami R, Kaplan MH, Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol* (2022) 186(6):3283–8. doi: 10.4049/jimmunol.1003049
40. Wan J, Wu Y, Ji X, Huang L, Cai W, Su Z, et al. IL-9 and IL-9-producing cells in tumor immunity. *Cell Communication and Signaling* (2020) 18:50. doi: 10.1186/s12964-020-00538-5
41. Bost P, Giladi A, Liu Y, Bendjelal Y, Xu G, David E, et al. Host-viral infection maps reveal signatures of severe COVID-19 patients. *Cell [Internet]*. (2020) 181(7):1475–1488.e12. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.006
42. Grant RA, Morales-Nebreda L, Markov NS, Swaminathan S, Querrey M, Guzman ER, et al. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature* (2021) 590:635–41. doi: 10.1038/s41586-020-03148-w
43. Kong Y, Han J, Wu X, Zeng H, Liu J, Zhang H. VEGF-d: A novel biomarker for detection of COVID-19 progression. *Crit Care* (2020) 24(1):1–4. doi: 10.1186/s13054-020-03079-y
44. Marshall JC, Murthy S, Diaz J, Adhikari N, Angus DC, Arabi YM, et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis* (2020) 20(8):e192–7. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30483-7
45. Metsalu T, Vilo J. The RECOVERY collaborative group. dexamethasone in hospitalized patients with covid-19. *N Engl J Med* (2021) 384(8):693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436
46. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(W1):W566–70. doi: 10.1093/nar/gkv468