



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAROLINE YUKARI MOTOORI FERNANDES

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *PDCD1*
COM INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS**

Londrina
2022

CAROLINE YUKARI MOTOORI FERNANDES

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *PDCD1*
COM INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira
Coorientador: Prof^o. Dr^o. Mateus Nobrega Aoki

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F363e Fernandes, Caroline Yukari Motoori.
Estudo de associação do polimorfismo PDCD1 com infecção por SARS-CoV-2 em pacientes oncológicos e não oncológicos / Caroline Yukari Motoori Fernandes. - Londrina, 2022.
67 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.
Coorientador: Mateus Nobrega Aoki.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.
Inclui bibliografia.

1. PD-1 - Tese. 2. Polimorfismos - Tese. 3. COVID-19 - Tese. 4. Pacientes oncológicos - Tese. I. Oliveira, Karen Brajão de . II. Aoki, Mateus Nobrega . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

CAROLINE YUKARI MOTOORI FERNANDES

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *PDCD1*
COM INFECÇÃO POR SARS-CoV-2 EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS E NÃO ONCOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Ligia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Carolina Batista Ariza Tamarozzi
Centro Universitário Filadélfia - Unifil

Londrina, 01 de abril de 2022.

Dedico este trabalho à minha avó
Shizue Motoori, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Mãe Três Vezes Admirável de Schoenstatt, que sempre estiveram presentes em minha vida, restituindo minhas forças, acalentando meu coração e guiando todos os meus passos

À Prof^a. Dr^a. Karen Brajão de Oliveira, maravilhosa orientadora, que assumiu e me acolheu com todo o carinho e dedicação. À minha querida orientadora de coração, a Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe, por sempre acreditar em mim e por me permitir ser feliz trabalhando com aquilo que me engrandece e me desafia todos os dias. Ambas fizeram com que esse trabalho fosse extremamente leve e edificador, sou extremamente grata a vocês.

Ao meu incrível coorientador, Prof. Dr. Mateus Nobrega Aoki que se dispôs a responder todas as minhas incontáveis mensagens, pela sua paciência e apoio, é um prazer imenso poder ter contado com sua orientação e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Bruna Karina Banin Hirata, parte fundamental dessa dissertação. Obrigada pela paciência, ajuda, pelo carinho, amizade e por compartilhar seu conhecimento.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Ligia Carla Faccin Galhardi e Prof^a. Dr^a. Carolina Batista Ariza Tamarozzi, pelo aceite em avaliar o trabalho e pela colaboração e contribuição para a melhora do mesmo.

Aos meus pais, Marcia Sayuri Motoori e Leonildo Fernandes, por sempre me levantarem e acreditarem em mim, muitas vezes mais do que eu mesma. Graças a vocês cheguei ao momento presente, repleta de amor e felicidade. Ao meu irmão e melhor amigo, Gustavo Eidi Motoori Fernandes.

À família do Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos Genéticos e Imunologia da Universidade Estadual de Londrina, Alberto, Glauco, Isaura, Luiz, Marla, Mayara, Nathália, Vânia, Sarah. Sou imensamente grata pela amizade e pelas referências que aqui encontrei.

Aos meus queridos amigos e parceiros do mestrado (Luca, João Vinícius e Beatriz Hoffman), e mesmo aqueles que me acompanharam e me ajudaram de longe (Ellen, Lorenza).

Às minhas irmãs de alma, cuja amizade e amor já passam de dez anos, Lóri Érica e Bárbara Piotto. Obrigada também aos de sempre, pelas palavras sinceras, incentivo, e pelo apoio incondicional. Neuza, Dinalva, Arlindo, Valdemar, Kazuko, Elio, Darla. A última é um cachorro, mas ela fez por merecer. Todos vocês são um presente de Deus.

A todas as pessoas que participaram desta pesquisa e sem as quais seria impossível dar continuidade com a mesma. Obrigada por permitirem o desenvolvimento deste estudo, embora suas condições de saúde fossem por vezes frágeis e o momento extremamente delicado. Deixo aqui nossa pequena contribuição à compreensão desta doença.

À equipe do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) que auxiliou na coleta de amostras utilizadas neste estudo e pelo auxílio na pesquisa de informações clínicas das pacientes.

À Universidade Estadual de Londrina que fez possível a realização deste trabalho.

As agências de fomento, CNPq, CAPES e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela formação científica e profissional.

MOTOORI-FERNANDES, C. Y. **Estudo de associação do polimorfismo *PDCD1* com infecção por SARS-CoV-2 em pacientes oncológicos e não oncológicos.** 2022. 71 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A COVID-19 (Doença por Coronavírus 2019), doença causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, continua a se espalhar mesmo após 2 anos de sua descoberta. Estudos demonstraram que pacientes com câncer correm um alto risco de desenvolver COVID-19 grave, em especial aqueles em tratamento ativo contra o câncer ou com doença metastática. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1), expressa principalmente por linfócitos T, faz parte de um importante ponto de checagem da resposta imune, podendo contribuir para a tumorigênese quando associado ao seu ligante PD-L1 ou PD-L2, expresso por células tumorais. Sabe-se que polimorfismos genéticos podem causar alterações estruturais e quantitativas, influenciando na resposta imunológica, além de poderem contribuir para variações individuais na resposta imune a patógenos e tecidos epiteliais com alta expressão de receptores para o SARS-CoV-2. Dentro desse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a associação do polimorfismo *PDCD1* em voluntários confirmados ou não para COVID-19 (COVID⁺ ou ⁻) e oncológicos ou não (CÂNCER⁺ ou ⁻). Para isto, realizou-se um estudo caso-controle, analisando o SNP *PDCD1* rs41386349 por discriminação alélica utilizando-se sondas de hidrólise em ensaios validados para reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). No estudo de associação voluntários COVID⁺/CÂNCER⁺ tiveram pior evolução clínica do que pacientes CÂNCER⁻ (Tau-b = 0,228; p = 0,001). Na análise de correlação entre a presença de câncer e o número de dias decorridos entre o diagnóstico e a alta hospitalar em pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ e em pacientes COVID⁺/CÂNCER⁻, encontramos uma correlação positiva, onde pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ demoraram mais para receber alta (Tau-b = 0,122; p = 0,030) e foram a óbito mais cedo em comparação aos pacientes não oncológicos (Tau-b = -0,157; p = 0,028). Quando estratificamos as amostras por sexo, a piora da infecção por SARS-CoV-2, incluindo pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ e CÂNCER⁻, foi positivamente correlacionada com o sexo masculino (Tau-b = 0,173; p = 0,005). No entanto, nenhuma associação foi encontrada avaliando o polimorfismo no gene *PDCD1* considerando a infecção por SARS-CoV-2. Embora mais estudos sejam necessários, podemos sugerir que pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ têm um pior curso clínico e desfecho de morte do que pacientes COVID⁻/CÂNCER⁺, e o sistema imunológico masculino também pode explicar os riscos divergentes relacionados à infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: PD-1; polimorfismos; COVID-19; pacientes oncológicos.

MOTOORI-FERNANDES, C. Y. **Association study of PDCD1 polymorphism with SARS-CoV-2 infection in oncological and non-oncological patients.** 2022. 71 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), a disease caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2, continues to spread even after 2 years of its discovery. Studies have shown that cancer patients are at a high risk of developing severe COVID-19, especially those on active cancer treatment or with metastatic disease, and the COVID-19 pandemic has disrupted their optimal management. Programmed cell death protein 1 (PD-1), expressed mainly by T lymphocytes, is part of an important checkpoint of the immune response, and may contribute to tumorigenesis when associated with its ligand PD-L1 or PD-L2, expressed by tumor cells. It is known that genetic polymorphisms can cause structural and quantitative changes, influencing the immune response, in addition to contributing to individual variations in the immune response to pathogens and epithelial tissues with high expression of receptors for SARS-CoV-2. The present study aims to evaluate the association of the *PDCD1* polymorphism in volunteers confirmed or not for COVID-19 (COVID+ or -) and oncological or not (CANCER + or -). For this, a case-control study was carried out, analyzing the SNP *PDCD1* rs41386349 by allelic discrimination using hydrolysis probes in validated assays for real-time polymerase chain reaction (qPCR). In the association study, COVID+/CANCER+ volunteers had worse clinical outcomes than CANCER- patients (Tau-b = 0.228; p = 0.001). In the correlation analysis between the presence of cancer and the number of days elapsed between diagnosis and hospital discharge in COVID+/CANCER+ patients and in COVID+/CANCER- patients, we found a positive correlation, where COVID+/CANCER+ patients took longer to be discharged. (Tau-b = 0.122; p = 0.030) and died earlier compared to non-cancer patients (Tau-b = -0.157; p = 0.028). When we stratified samples by sex, worsening SARS-CoV-2 infection, including COVID+/CANCER+ and CANCER- patients, was positively correlated with male sex (Tau-b = 0.173; p = 0.005). However, no association was found evaluating the polymorphism in the *PDCD1* gene considering SARS-CoV-2 infection. Although more studies are needed, we can suggest that COVID+/CANCER+ patients have a worse clinical course and death outcome than COVID-/CANCER+ patients, and the male immune system may also explain the divergent risks related to SARS-CoV-2 infection.

Key words: *PD-1*; polymorphisms; COVID19; cancer patients.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura esquemática do gene *PDCD1* e localização do polimorfismo genético 7209 C>T (rs41386349) no íntron 420

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estratificação da Gravidade da doença COVID-19.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARDS	Síndrome do desconforto respiratório agudo
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDs	Células Dendríticas
COVID-19	Doença por Coronavírus 2019
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IC95%	Intervalo de Confiança utilizando 95% como coeficiente de confiança
ICIs	Ponto de controle imunológico
IFN γ	Interferon gamma
IL- β	Interleucina beta
IL-12	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Kilo Dalton
MERS-CoV	Síndrome respiratória do Oriente Médio
NK	Células <i>natural killers</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1/2	Ligante de morte programada 1/2
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RUNX1</i>	Fator de transcrição 1 relacionado à runt
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave 2
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
SLE	Lupus Eritematoso Sistêmico
SOFA	Falência de órgãos sequencial elevada
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	SARS-CoV-2	13
2.1.1	Caracterização Clínica da COVID-19	14
2.1.2	Implicações da COVID-19 Para Pacientes Com Câncer.....	16
2.2	PROTEÍNA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA 1 (PD-1).....	18
2.2.1	Alterações do Gene PDCD1	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVOS GERAIS	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	COLETA DE AMOSTRAS	23
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA	24
4.3	GENOTIPAGEM POR QPCR.....	24
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	26
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	57
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	58
	ANEXO B – Aprovação do comitê de ética em pesquisa de Curitiba, Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer ...	63

1 INTRODUÇÃO

Já foi descrito pela literatura que indivíduos com COVID-19 e câncer apresentam maior probabilidade de doença grave e mortalidade. Dado o risco de doença grave, relatórios que caracterizam a apresentação e os resultados da COVID-19 em pacientes com câncer são de extrema urgência para orientar a tomada de decisão. Essa necessidade é especialmente relevante para pacientes que estão recebendo imunoterapia. Nesse contexto, já foi evidenciado que o bloqueio da proteína de morte programada 1 (PD-1) melhorou a sobrevida em pacientes com vários tipos de câncer incuráveis, mas há incerteza sobre o impacto potencial de imunoterapia no âmbito da COVID-19 (LUO *et al.*, 2020).

A primeira manifestação do surto de doença respiratória foi identificada pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) da China, e ocorreu em trabalhadores de um mercado de alimentos de Wuhan, capital da província de Hubei, em dezembro de 2019. Posteriormente, identificou-se como causador da doença um novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2 (ZHOU *et al.*, 2020). Desde então, a COVID-19 tornou-se uma pandemia global afetando >200 países e territórios. Em virtude da súbita pandemia do coronavírus e o aumento exponencial de pacientes, a COVID-19, apresentou desfechos sociais, econômicos e de saúde muito deletérios aos seres humanos (NISHIGA *et al.*, 2020).

SARS-CoV-2 pertence ao gênero Betacoronavírus, assim como as duas outras viroses os outros coronavírus pandêmicos causador da primeira síndrome respiratória aguda SARS-CoV-1 e do Oriente Médio (MERS-CoV). A infecção não controlada por SARS-CoV-2, pode desencadear, além dos sintomas respiratórios uma tempestade de citocinas como o TNF- α , IL- β e IL-6, levando o dano de múltiplos órgãos, como pneumonia e falência respiratória devido a danos alveolares (CHEN *et al.*, 2020; NISHIGA *et al.*, 2020; TAY *et al.*, 2020).

Na COVID-19, o espectro clínico da doença é muito amplo, variando de sintomas leves gripais à insuficiência respiratória com risco de vida (RABI *et al.*, 2020). Além disso, estudos demonstraram que indivíduos mais velhos e com comorbidades e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes, hipertensão, câncer, entre outras estão associados com os casos mais severos da COVID-19 (HUANG *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

O câncer por si só já é a principal causa de morte e um dos principais

problemas de saúde pública, constituindo uma barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo (SUNG *et al.*, 2021). De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano de 2019, o câncer já é a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 112 dos 183 países e ocupa o terceiro ou quarto lugar em mais 23 países. No Brasil, o número de novos casos foi de 522.212, com aproximadamente 260.000 mortes por câncer. Embora o número de casos de infecções nesses pacientes seja pequeno, os pacientes com câncer em tratamento oncológico parecem ter maior risco de infecção grave por SARS-CoV-2.

É conhecido que após o período de incubação, o SARS-CoV-2 causa sintomas não graves e induz uma resposta imune benéfica e nesse período, estratégias para aumentar a resposta imune podem ser aplicadas. Em suma, para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora nos estágios de incubação e fase em agravamento, o hospedeiro deve estar fisiologicamente competente e apresentar um perfil genético apropriado que seja capaz de induzir imunidade antiviral específica (XU *et al.*, 2020). Nesta primeira fase, se o vírus não é eliminado, o paciente entra no estágio grave, caracterizada por resposta inflamatória intensa e prejudicial, principalmente nos pulmões (SHI *et al.*, 2020).

Além disso, as diferenças genéticas contribuem para variações individuais na resposta imune a patógenos e tecidos epiteliais com alta expressão de receptores para o SARS-CoV-2, podendo levar a extensos danos aos tecidos (XU *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020). Portanto, é recomendado que todos os pacientes oncológicos em tratamento tenham cuidado redobrado para não adquirir a infecção por SARS-CoV-2, evitando contato com pessoas com sintomas e que tenham viajado para áreas com a epidemia. E a principal orientação é para que os pacientes não interrompam seu tratamento oncológico (UEDA *et al.*, 2020).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 SARS-CoV-2

O coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) pertence à família *Coronaviridae* e provoca uma doença respiratória, chamada de COVID-19. Os vírus da subfamília Coronavírus possuem RNA de fita simples de sentido positivo, variam de 60 a 140 nm de diâmetro com projeções tipo espículas na sua superfície, dando a aparência de uma coroa quando observados em microscopia eletrônica (RICHMAN et al., 2016).

Dois eventos semelhantes, nas duas décadas passadas em que ocorreu contaminação cruzada entre coronavírus de animais não humanos e humanos, resultando em doença severa. A primeira ocorreu em 2002/2003, um Betacoronavírus com origens em morcegos na província de Guangdong na China. Esse vírus foi denominado de coronavírus da síndrome aguda respiratória severa (SARS) o qual afetou mais de 8 mil pessoas causando mais de 900 mortes (taxa de mortalidade de 11%). Praticamente uma década depois, em 2012, um outro vírus, também com origem em morcegos, causou a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), surgiu na Arábia Saudita afetando quase 2500 pessoas, com uma taxa de mortalidade de 34% (RABI et al., 2020). Da mesma forma, que o SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 utiliza a ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) como um receptor de entrada nas células-alvo (ZHOU et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020).

Clinicamente, as respostas imunes induzidas pela infecção por SARS-CoV-2 são bifásicas. Durante o estágio de incubação o qual não apresenta severidade, é necessária uma resposta imune adaptativa específica para eliminar o vírus e impedir a progressão da doença para estágios mais graves. Portanto, estratégias para aumentar a resposta imune nesta fase são certamente importantes. Para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora nos estágios de incubação e fase em agravamento, o hospedeiro deve estar fisiologicamente competente e apresentar um perfil genético apropriado que seja capaz de induzir imunidade antiviral específica (XU et al., 2020).

É conhecido que as diferenças genéticas contribuem para variações individuais na resposta imune a patógenos e tecidos epiteliais com alta expressão de

ECA2, podendo levar a extensos danos aos tecidos; como resultado, causa inflamação severa e, subsequentemente, danifica os tecidos-alvo; incluindo rins e pulmões (XU et al., 2020; SHI et al., 2020). No entanto, quando uma resposta imune protetora é prejudicada ou ineficiente, o vírus pode se propagar e conseqüentemente promover uma destruição potencializada dos tecidos afetados. As células danificadas induzem inflamação nos pulmões, que é amplamente mediada por células com perfis pró-inflamatórios. A inflamação pulmonar é a principal causa de distúrbios respiratórios com risco de vida no estágio grave (XU et al., 2020).

Portanto, é razoável supor que a fisiologia imune saudável pode não ser vantajosa para pacientes que avançaram para o estágio com danos pulmonares mais graves (SHI et al., 2020), sendo necessário esforços para suprimir a inflamação e controlar os sintomas.

Indicando que uma reação imune com propósito de eliminar o vírus SARS-CoV-2 pode apresentar dificuldade de induzir resposta imune com memória, após a alta hospitalar, alguns pacientes permanecem/retornam positivos para o vírus e outros apresentam recaída. E, pelo menos em alguns pacientes, as vacinas poderão não funcionar efetivamente. Esses cenários devem ser considerados ao determinar as estratégias de desenvolvimento de vacinas. Além disso, existem muitos tipos ou subtipos de coronavírus (SHI et al., 2020).

A síndrome de liberação de citocinas parece afetar pacientes em condições graves da doença. A linfocitopenia, por exemplo, é frequentemente observada em pacientes graves com COVID-19 e a liberação de citocinas deve ser mediada por vários tipos celulares. É comum uma alta contagem de leucócitos, em associação com linfocitopenia, como critério diagnóstico diferencial para o COVID-19 (SHI et al., 2020).

Algumas moléculas do sistema imunológico são candidatos a influenciar no prognóstico do COVID-19. As células T, por exemplo necessitam ser ativadas por citocinas para exercer seus efeitos anti-inflamatórios, que podem estar ausentes em pacientes severamente afetados, pois as células T não são bem ativadas pela infecção por SARS-CoV-2 (WANG, G. et al., 2018).

2.1.1 Caracterização Clínica da COVID-19

Visando diminuir e cessar a velocidade de transmissão, fornecer atendimento otimizado para a grande maioria dos pacientes e reduzir o impacto do

caráter pandêmico nos sistemas de saúde, serviços sociais e atividade econômica, a OMS desenvolveu e descreveu as principais medidas a serem tomadas nos respectivos cenários de transmissão.

A prevenção e o controle de infecções são uma parte crítica e integrante do manejo clínico dos pacientes, para tal a OMS estima que a maioria das pessoas com COVID-19 desenvolve apenas a manifestação leve da doença ou moderada, e aproximadamente 15% desenvolvem doença grave dependente de suporte de oxigênio, enquanto a minoria (5%) têm doença crítica com complicações como insuficiência respiratória, síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), sepse e choque séptico, tromboembolismo e/ou insuficiência de múltiplos órgãos, incluindo lesão renal aguda e lesão cardíaca (Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, 2020). Além disso, idade avançada, tabagismo (ALQAHTANI *et al.*, 2020; Geneva: World Health Organization, 2020) e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como diabetes, hipertensão, doença cardíaca, doença pulmonar crônica e câncer, foram relatadas como fatores de risco para doença grave e morte, e análises multivariadas confirmaram que a idade avançada, a avaliação de falência de órgãos sequencial mais elevada (SOFA) e escore e dímero-D > 1 µg / L na admissão, já foram associados a maior mortalidade (HUANG *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020) (Tabela 1).

Embora os sinais e sintomas de apresentação da infecção por SARS-CoV-2 variem, a maior parte das pessoas manifesta febre (83-99%), tosse (59-82%), fadiga (44-70%), anorexia (40-84%), falta de ar (31-40%), mialgias (11-35 %). Outros sintomas inespecíficos, como dor de garganta, congestão nasal, dor de cabeça, diarreia, náuseas e vômitos, também foram relatados (HUANG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020; GUAN *et al.*, 2020). A perda do olfato, conhecida como anosmia ou do paladar (ageusia) precedendo o início dos sintomas respiratórios também foi relatada (SPINATO *et al.*, 2020; GIACOMELLI *et al.*, 2020; TONG *et al.*, 2020). Segundo ARONS e colaboradores (2020) idosos e pacientes imunossuprimidos podem manifestar sintomas menos típicos, tais como fadiga, redução do estado de alerta, mobilidade comprometida, diarreia, perda de apetite, delírio e ausência de febre.

Quadro 1 – Estratificação da Gravidade da doença COVID-19.

Doença Leve	Pacientes sintomáticos que se enquadrem à definição de caso para COVID-19, sem evidência de pneumonia viral ou hipóxia.
Doença Moderada	Pneumonia Sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia, respiração rápida), mas sem sinais de pneumonia grave, em adolescentes e adultos e em crianças sinais clínicos de pneumonia não grave (tosse ou dificuldade em respirar + respiração rápida e / ou tiragem torácica) e sem sinais de pneumonia grave.
Doença Grave	Pneumonia Grave Adolescente ou adulto apresentam sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia, respiração rápida) com acréscimos de frequência respiratória > 30 respirações / min; dificuldade respiratória grave; ou SpO ₂ < 90% no ar ambiente. Crianças manifestam sinais clínicos de pneumonia (tosse ou dificuldade em respirar) e cianose central ou SpO ₂ < 90%; dificuldade respiratória grave; incapacidade de amamentar ou beber, letargia, inconsciência ou convulsões ou respiração rápida.

SpO₂: Saturação periférica de oxigênio.

Fonte: Adaptado de World Health Organization, Clinical management of COVID-19, Interim guidance (2020).

2.1.2 Implicações da COVID-19 Para Pacientes Com Câncer

O próprio câncer ao exercer um estado imunossupressor crônico, que pode ser exacerbado por terapias citotóxicas, leva a um risco maior de contrair infecção, se comparado a população geral (PENN et al., 1973; ADDEO, FRIENDLAENDER 2020). Como consequência, espera-se que pacientes com câncer tenham maior risco, tanto de infecção quanto de complicações, durante a infecção por SARS-CoV-2. Addeo e Friendlaender (2020) observaram, diante desse cenário, que uma infecção pode resultar em implicações prognósticas diretas ou indiretas, com complicações graves ou mortais e atrasos no tratamento do câncer ou hospitalizações, que podem prejudicar a eficácia da terapia e levar à morbidade relacionada ao câncer ou mesmo à morte, respectivamente.

Recentemente vários trabalhos evidenciam o provável impacto da pandemia por COVID-19 em pacientes com câncer. Ruan e colaboradores mostraram que, dentre os pacientes que morreram de COVID-19, 63% tinham uma doença de base, em sua maioria câncer, enquanto 41% dos pacientes que receberam alta não

(RUAN et al., 2020). Corroborando com achados do aumento da mortalidade devido ao COVID-19 em pacientes com câncer, um estudo prospectivo e observacional multicêntrico com 105 pacientes com câncer e 536 controles livres de neoplasias, ambos os grupos positivos para COVID-19 e pareados por idade, relatou que pacientes com câncer tiveram maiores taxas de morte, admissão na UTI, desenvolvendo pelo menos um sintoma grave ou crítico e necessidade de ventilação mecânica (DAI et al., 2020).

Duas experiências de Nova York foram publicadas, na primeira, Metha e colaboradores (2020) relataram mortalidade por COVID-19 em pacientes com câncer no Centro Médico Montefiore. Um total de 218 pacientes positivos para a infecção e com malignidade foi identificado de 18 de março a 8 de abril de 2020. Nesta coorte, 61 (28%) dos pacientes com câncer morreram de COVID-19 com uma taxa de letalidade de 37% para neoplasias hematológicas e 25% para neoplasias sólidas. Na segunda série, no Memorial Sloan Kettering Cancer Center, relataram a epidemiologia da doença COVID-19 vivenciada em seu centro, com uma análise dos fatores de risco para infecção grave em populações de pacientes com câncer. Aproximadamente 40% dos pacientes com câncer diagnosticado com COVID-19 foram internados, 20% desenvolveram doença respiratória grave e 9% foram a óbito (ROBILOTTI, et al., 2020). Em ambos a mortalidade também foi associada à idade avançada e à presença de múltiplas comorbidades, além disso ter tido inibidores do ponto de controle imunológico (ICIs) nos últimos 3 meses ou manter o tratamento quimioterápico foram fatores preditivos associados à hospitalização e doença grave.

Em contrapartida, no Gustave Roussy Cener Campus relatou dados sobre 137 pacientes com COVID-19 e câncer, sendo os cânceres hematológicos e de mama. Quase 60% tinham doença avançada ativa, enquanto 40% estavam em remissão ou sendo tratados com terapia potencialmente curativa. Em toda a coorte, 25% tiveram piora do COVID-19 após a admissão, 11% foram internados na UTI e 15% morreram. Pacientes afetados por câncer hematológico eram mais propensos a ter resultados piores, além disso, o tratamento com quimioterapia nos últimos três meses, mas sem terapia direcionada ou imunoterapia, dobrou a probabilidade de agravamento da doença (FABRICE et al., 2020).

Ou seja, pacientes com câncer correm um alto risco de desenvolver COVID-19 grave, em especial aqueles em tratamento ativo contra o câncer ou com doença metastática (CHUN et al, 2021). Desse modo, a European Society of Medical

Oncology, a American Society of Clinical Oncology e a National Comprehensive Cancer Network recomendaram todas as vacinas COVID-19 para pacientes com câncer com alta prioridade, a menos que tenham contraindicações à vacinação. No entanto, as evidências sobre a imunogenicidade da vacina e a durabilidade da proteção vacinal ainda são insuficientes em pacientes com câncer, especialmente naqueles imunocomprometidos ou em tratamento específico contra o câncer (CHUN et al, 2021).

Dados limitados estão disponíveis sobre a taxa e aceitação das vacinas COVI-19 em pacientes oncológicos, uma vez que geralmente mesmo as taxas de vacinação contra influenza entre pacientes com câncer são baixas devido a preocupações sobre a interação entre a vacina e a doença maligna, bem como os potenciais efeitos colaterais (CHUN et al, 2021; VINOGRAD et al, 2014; POEPPL et al, 2015). Chun e colaboradores (2021) relataram que a taxa de aceitação dos pacientes coreanos com câncer em relação a vacinação COVID-19 foi de 61,8%.

Essa hesitação vacinal pode dificultar a disseminação rápida e ampla da vacinação contra o COVID-19, no qual os profissionais da saúde devem desempenhar um papel importante no auxílio aos pacientes com câncer na tomada de decisão sobre vacinas COVID-19.

2.2 Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1)

A proteína de morte programada-1 (PD-1), referida também como CD279, integra à grande família CD28/B7 de moléculas coestimulatórias (KEIR et al., 2008), e elas por sua vez são responsáveis por fornecer os sinais críticos para estimular a ativação e inibição de células T e outras células do sistema imunológico (MCADAM; SCHWEITZER; SHARPE, 1998). O PD-1 é expresso em células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, células NK, linfócitos B, monócitos ativados, algumas células dendríticas (CDs) e em células T tumor-específicas (KEIR et al., 2008; AHMADZADEH et al., 2009). Além da função de regular o sistema imunológico, promove a auto-tolerância através da supressão da atividade de células T durante o processo inflamatório exacerbado, prevenindo a ocorrência de doenças autoimunes (LATCHMAN et al., 2001). Entretanto, sua atividade inibitória impede que células T citotóxicas atuem induzindo a morte celular em células tumorais (SYN et al. 2017) além disso, já foi levantada a hipótese de um papel protetor do bloqueio anti-PD-1 na primeira fase de uma infecção viral (ZHENG et al., 2010).

PD-1 é 15% semelhante à sequência de aminoácidos de CD28, 20% semelhante a proteína 4 associada ao linfócito T (CTLA-4) e 13% semelhante ao co-estimulador de células T induzido (CARRENO; COLLINS, 2020), é uma proteína transmembranar de 55 kDa e 288 aminoácidos, codificado pelo gene *PDCD1* (NEEL et al., 2003). Possui dois ligantes, PDL-1 e PDL-2, membros da família B7 (FREEMAN et al., 2000), o PDL-1 (também referido como CD279 e B7-H1) é geralmente expresso por macrófagos, algumas células T ativadas e células B, células dendríticas (CDs) e algumas células epiteliais, particularmente em condições inflamatórias (SHARPE et al., 2007). Além disso, o PD-L1 está associado a um ambiente imunológico rico em células T CD8, produção de citocinas Th1 e fatores químicos, bem como interferons e características específicas de expressão de genes (JI et al., 2015).

Em pacientes com COVID-19, a população de células T CD8⁺ passa por alterações de caráter qualitativo e quantitativo. A linfopenia afeta preferencialmente as células T CD8⁺ (MATHEW al., 2020; MAZZONI et al., 2020), e baixos números de células T CD8⁺ são encontrados nos estados graves da doença (CHEN et al., 2020; MAZZONI et al., 2020), as células T CD8⁺ provenientes do fluido do lavado broncoalveolar de pacientes graves e críticos também exibiram uma falta de clones dominantes em comparação com pacientes com COVID-19 leve (LIAO et al., 2020). Além disso, uma série de estudos relatou um fenótipo exaurido de células T CD8⁺ na doença grave, com aumento da expressão de receptores inibitórios, particularmente PD-1 (DE BIASI et al., 2020; DIAO et al., 2020; SONG et al., 2020; ZHENG et al., 2010). No entanto, não está claro se as células T PD-1⁺ CD8⁺ estão realmente esgotadas ou ativadas em pacientes com COVID-19 (RHA et al., 2020).

Entretanto, alguns estudos relatam respostas de células T CD8⁺ reativas à SARS-CoV-2 em indivíduos com COVID-19 (GRIFONI et al., 2020; LE BERT et al., 2020; WEISKOPF et al., 2020). No entanto, esses ensaios têm limitações inerentes para a caracterização adequada de células T CD8⁺ específicas para SARS-CoV-2, no qual não podem detectar células T CD8⁺ específicas de vírus que não estão funcionando, e fenótipos de células T CD8⁺ podem mudar durante estimulação invitro. Nas evidências com ICIs, foi observado que o bloqueio funcional de PD-1 e CTLA-4 pode reverter o fenótipo T CD8⁺ exaurido, melhorando a imunidade específica do antígeno e os efeitos antivirais contra o SARS-CoV2 (ZHENG et al., 2020).

2.2.1 Alterações do Gene *PDCD1*

O gene *PDCD1* (codificante para a proteína PD-1) é constituído de 5 éxons codificantes e 4 íntrons (Figura 1), sendo localizado no braço longo do cromossomo 2, no locus 37.3. Mais de 30 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *PDCD1* já foram identificados em diversas regiões do gene, dentre eles: PD-1.5 (rs2227981), PD-1.9 (rs2227982), PD-1 rs7421861, PD-1.3 (rs11568821) e PD-1 rs41386349 (PROKUNINA et al., 2002; LEE et al., 2006). O polimorfismo PD-1 C>T (rs41386349) encontra-se no íntron 4 do gene *PDCD1*, em uma região acentuadora do gene, na posição 7209, (PROKUNINA et al., 2002), ou seja, pode ser referido então por 7209 C>T.

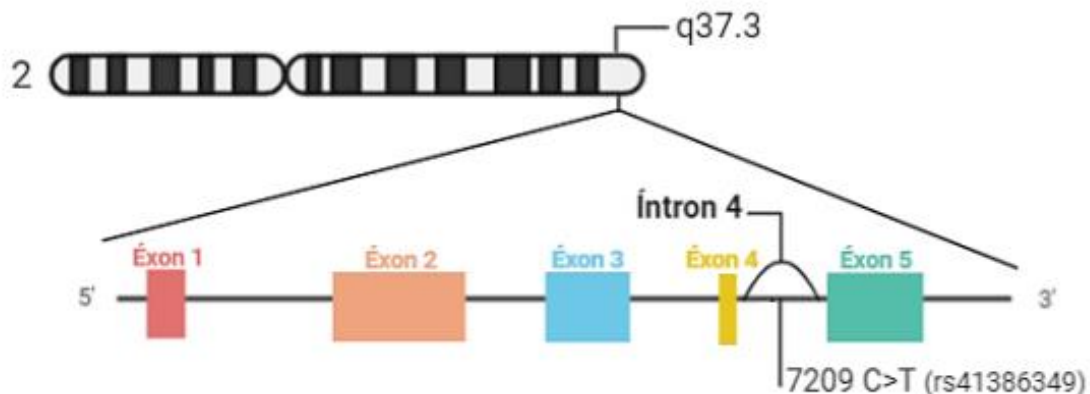


Figura 1 - Estrutura esquemática do gene *PDCD1* e localização do polimorfismo genético 7209 C>T (rs41386349) no íntron 4. Adaptado de BioRender.com, 2021

O polimorfismo PD-1 7209 C> T está próximo aos sítios de ligação NF- κ B e *RUNX1*. Sugere-se que a mudança de C para T afete a afinidade de ligação desses fatores de transcrição, levando a uma alteração na expressão de PD-1 (PROKUNINA et al., 2002; TSENG et al., 2019).

Em suas implicações, Wang e colaboradores (2006) mostraram que a ocorrência do alelo C correlaciona-se à diminuição da expressão de PD-1. Entretanto, Mostowska et al. e Zheng et al. observaram que o alelo T era predominante em pacientes acometidos com Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE) e infecções virais, respectivamente, levando a hipótese de que o alelo T ocasiona menor atividade transcricional do PD-1 em células T humanas (MOSTOWSKA et al., 2008. ZHENG et al., 2010). Tal divergência observada na ocorrência de diferentes alelos pode estar

relacionada a variações populacionais, podendo apresentar ou não relação com doenças autoimunes (PROKUNINA et al., 2002; FERREIROS-VIDAL et al., 2004) e diversos tipos de câncer (SALMANINEJAD et al., 2017).

Como já ressaltado, foi relatado que estudos iniciais em indivíduos com COVID-19 e câncer apresentam maior probabilidade de doença grave e mortalidade. Dado o risco de doença grave, estudos que caracterizem a apresentação e os resultados do COVID-19 em pacientes com câncer são de extrema urgência para orientar a tomada de decisão. Essa necessidade é especialmente relevante para pacientes que estão recebendo imunoterapia. Vale ressaltar, que o bloqueio da morte programada 1 (PD-1) melhorou a sobrevida em pacientes com vários tipos de câncer incuráveis, mas há incerteza sobre o impacto potencial de imunoterapia no âmbito da COVID-19 (LUO et al., 2020). Dessa forma, pesquisas que visam elucidar as possíveis variações genéticas relacionadas ao agravamento da COVID-19 em pacientes oncológicos podem inferir e contribuir para um prognóstico específico de uma dada população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar o polimorfismo genético do receptor de morte programada 1 (PD-1) e a patogênese e prognóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 em pacientes com e sem câncer.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *PDCD1* 7209 C>T (rs41386349) a partir de amostras de DNA de pacientes estratificados de acordo com a presença de câncer (CÂNCER⁺ ou CÂNCER⁻) de diferentes subtipos e a presença de infecção pelo SARS-CoV-2 (COVID⁺ ou COVID⁻).
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle entre o polimorfismo *PDCD1* 7209 C>T (rs41386349) em um grupo controle e em pacientes COVID⁺/ CÂNCER⁺.
- Avaliar a correlação do polimorfismo *PDCD1* 7209 C>T (rs41386349) comparâmetros prognósticos de pacientes com COVID⁺/ CÂNCER⁺.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

O presente estudo foi submetido e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (n=203), CAAE nº 36247920.1.0000.5231 (Anexo A) e pelo Comitê de Ética de Curitiba, Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer (n=260) CAAE nº 31592620.4.1001.0098 (Anexo B).

O convite às pacientes para participarem deste projeto de pesquisa ocorreu durante o atendimento clínico nos serviços especializados. As amostras do grupo estratificado em pacientes positivos para COVID-19, classificado como leve, foram provenientes da Unidade Básica de Saúde de Londrina e do Hospital Universitário de Londrina, e as coletadas amostras positivas para a infecção nas formas moderadas e graves oncológicas e não oncológicas, provenientes do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba - Brasil), assim como o grupo de pacientes negativos para a infecção por SARS-CoV-2 diagnosticados com e sem neoplasias. Todas as coletas de amostras e condutas experimentais foram realizadas de acordo com as diretrizes e regulamentações brasileiras. Os procedimentos foram explicados a todos os participantes e o consentimento por escrito foi obtido antes da coleta do material.

Sangue periférico (5 mL) coletado com anticoagulante EDTA foi obtido de 289 amostras positivas para COVID-19, cujo critério de inclusão foi o exame de PCR em Tempo Real, (RT-PCR) para o SARS-CoV-2. Dentre as amostras positivas para a infecção 72 são portadoras de neoplasias e 217 doadoras sem história de neoplasia atual ou anterior, ambos os grupos estratificados segundo o estado da infecção por SARS-CoV-2. Das 289 amostras positivas para COVID-19 dentro do grupo oncológico, 52 são de neoplasias de tumores sólidos ou não hematológicos, 18 diagnosticadas com neoplasias hematológicas, em estados moderados e graves da infecção por SARS-CoV-2 e 2 de caráter oncológico desconhecido, mas em estado leve da infecção; no grupo não oncológico composto de 217 doadores foi estratificado em 187 em estado leve de COVID-19, 12 moderado, 14 em grave e 4 em estado desconhecido para a infecção.

As amostras de sangue periférico do grupo negativo para a infecção por SARS-CoV-2, são provenientes de 32 pacientes sem histórico de

neoplasias e 128 de pacientes portadores de tumores de diferentes subtipos, no qual 39 são neoplasias hematológicas e 89 não hematológicas. Como critério de inclusão foram selecionados doadores negativos para o exame de RT-PCR para o SARS-CoV-2. Vale ressaltar que os doadores estavam em caráter de isolamento pandêmico.

O critério para a classificação dos pacientes envolvidos no presente estudo seguiu a sistematização da Organização Mundial da Saúde (OMS), que estabeleceu, para o ano de 2020, o manejo de COVID-19 leve, moderado e grave e o estudo estabelecido por Williamson e colaboradores (2020), no qual as neoplasias hematológicas foram consideradas separadamente de outros cânceres a fim de se refletir acerca da sua imunossupressão. Após a adoção e validação destes fatores, estes foram classificados em pacientes que variam de formas leve, moderada e grave para a infecção por SARSCoV-2 e estratificados em doadores sem história de neoplasias ou pacientes com câncer (não hematológico ou de malignidade hematológica) (WILLIAMSON et al., 2020).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico utilizando o kit comercial Biopur Mini Spin kit (Biometrix Diagnóstica® Curitiba, Parana, Brazil) segundo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em um aparelho NanoDrop 2000c® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A absorbância no comprimento de onda de 260 nm foi utilizada para determinar a concentração de ácidos nucleicos e a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm foi utilizada para determinar o grau de pureza das amostras.

4.3 GENOTIPAGEM POR QPCR

A análise do polimorfismo genético foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando sondas fluorescentes TaqMan (VIC® ou FAM™) para o gene *PDCD1* 7209 C>T, rs41386349 no íntron 4.

Aproximadamente 1,1ng/μL de DNA diluídos foram amplificados com primers, sintetizados de acordo com as sequências depositadas no GenBank, e sondas fluorescentes específicos para determinação do polimorfismo proposto (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). As reações de amplificação foram realizadas com 2X TaqMan® Genotyping Master Mix (armazenado a 4°-8°C),

contendo dNTP, Mg^{2+} , buffer, Taq DNA polimerase, ROX; 40X TaqMan® Genotyping Assay (armazenado a $-20^{\circ}C$), composta pelos primers *forward* e *reverse*, e as sondas de hidrólise altamente específicas (MGB) e água ultrapura para PCR. Os níveis de fluorescência dos produtos de PCR foram avaliados em tempo real pelo termociclador Step One (Applied Biosystems).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação para o estudo caso–controle foram feitas pelo cálculo da Odds Ratio (OR). Para os polimorfismos individuais foram testados os modelos genotípicos (heterozigotos ou homozigotos variantes contra homozigotos selvagens), dominante (heterozigotos e homozigotos variantes contra homozigotos selvagens) e recessivo (homozigotos variantes contra homozigotos selvagens e heterozigotos). As análises de associação com parâmetros clínicos foram realizadas pelo teste de Qui–quadrado testando–se os modelos de associação contra os parâmetros clínicos categorizados. O cálculo do coeficiente de correlação Tau-b de Kendall foi realizado em seguida para traçar a tendência de possíveis correlações entre as variáveis genéticas e clínicas. Todos os testes estatísticos foram realizados nos softwares GraphPad Prism versão 8.0.0 (San Diego, California, USA) e no SPSS Statistics versão 17.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). Todos os testes adotaram nível de significância de $p < 0,05$.

5 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Male gender is a predictor of worse prognostic in cancer and SARS-COV2 infected patients independent of PDC1 gene polymorphism

Abstract

COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), a disease caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2, continues to spread even after 2 years of its discovery. Studies have shown that cancer patients are at a high risk of developing severe COVID-19, especially those on active cancer treatment or with metastatic disease, and the COVID-19 pandemic has disrupted their optimal management. Programmed cell death protein 1 (PD-1), expressed mainly by T lymphocytes, is part of an important checkpoint of the immune response, and may contribute to tumorigenesis when associated with its ligand PD-L1 or PD-L2, expressed by tumor cells. It is known that genetic polymorphisms can cause structural and quantitative changes, influencing the immune response, in addition to contributing to individual variations in the immune response to pathogens and epithelial tissues with high expression of receptors for SARS-CoV-2. The present study aims to evaluate the association of the *PDCD1* polymorphism in volunteers confirmed or not for COVID-19 (COVID+ or -) and oncological or not (CANCER + or -). For this, a case-control study was carried out, analyzing the SNP *PDCD1* rs41386349 by allelic discrimination using hydrolysis probes in validated assays for real-time polymerase chain reaction (qPCR). In the association study, COVID+/CANCER+ volunteers had worse clinical outcomes than CANCER- patients (Tau-b = 0.228; p = 0.001). In the correlation analysis between the presence of cancer and the number of days elapsed between diagnosis and hospital discharge in COVID+/CANCER+ patients and in COVID+/CANCER- patients, we found a positive correlation, where COVID+/CANCER+ patients took longer to be discharged. (Tau-b = 0.122; p = 0.030) and died earlier compared to non-cancer patients (Tau-b = -0.157; p = 0.028). When we stratified samples by sex, worsening SARS-CoV-2 infection, including COVID+/CANCER+ and CANCER- patients, was positively correlated with male sex (Tau-b = 0.173; p = 0.005). However, no association was found evaluating the polymorphism in the *PDCD1* gene considering SARS-CoV-2 infection. Although more studies are needed, we can suggest that COVID+/CANCER+ patients have a

worse clinical course and death outcome than COVID-/CANCER+ patients, and the male immune system may also explain the divergent risks related to SARS-CoV-2 infection.

Key-words: PD-1; polymorphisms; COVID19; cancer patients.

Introduction

COVID-19 is a severe acute respiratory syndrome, caused by this new variant of the coronavirus, a member of Betacoronavirus genus like the two other viruses that also caused pandemic diseases, the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV).

The COVID-19 clinical spectrum is very wide, ranging from mild flu symptoms to life-threatening respiratory failure (RABI et al., 2020). Infection prevention and control are a critical and integral part of the clinical management of patients, for which the WHO (2020) estimates that most people with COVID-19 develop only mild (40%) or moderate disease manifestations, about 40%, approximately 15% develop severe disease dependent on oxygen support, while a minority (5%) have critical illness with complications such as respiratory failure, acute respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis and septic shock, thromboembolism and/ or multiple organ failure, including acute kidney injury and cardiac injury (Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, 2020). In addition, studies have shown that older individuals and those with comorbidities and chronic non-communicable diseases (NCDs), such as diabetes, hypertension, cancer, among others, are associated with the most severe cases of COVID-19 (HUANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

The oncology community is under increasing pressure to protect cancer patients and ensure their safety by maintaining treatments. Thus, the importance of studying this infection in specific populations and sub-populations is highlighted, with the aim of verifying its relationships with different diseases, allowing inferences and contributing to a specific prognosis for a given population. So characterizing the presentation and results of COVID-19 in cancer patients are extremely urgent to guide decision-making.

Furthermore, genetic differences contribute to individual variations in the immune response to pathogens and epithelial tissues with high receptor expression for SARS-CoV-2, which can lead to extensive tissue damage (XU et al., 2020; SHI et al., 2020). Therefore, it is recommended that all cancer patients undergoing treatment take extra care not to acquire the SARS-CoV-2 infection, avoiding contact with people with symptoms and who have traveled to areas with the

epidemic (UEDA et al., 2020).

Recently, the PD-1 gene, also called *PDCD1*, has been designing worldwide attention to 2018 Nobel laureate Honjo, who described, along with others colleagues, for the first time in 1992 the PD-1 molecule (ISHIDA et al., 1992). Since Therefore, many researches have been developed to elucidate the functions of this molecule and in relation to the occurrence of diseases such as cancer (GANDINI et al., 2016; SYN et al., 2017). It has been shown in several studies that polymorphisms in *PDCD1* influence on protein expression and function, thus interfering with immunity host response (PROKUNINA et al., 2002; LEE et al., 2006).

The role of PD-1 in cancer has been investigated in recent years since its discovery, and lately it has been considered one of the main targets of immunotherapy, in which an anti-PD-1 antibody blocks its recognition site for its ligand, preventing cell inactivation, allowing its antitumor response to develop (WEBER, 2010; SYN et al., 2017).

It has already been described in the literature that individuals with COVID-19 and cancer are more likely to have severe illness and mortality. Given the risk of serious illness, reports characterizing the presentation and outcomes of COVID-19 in cancer patients are of utmost urgency to guide decision making. This need is especially relevant for patients who are receiving immunotherapy. In this context, it has already been shown that blocking programmed death 1 (PD-1) has improved survival in patients with several incurable cancers, but there is uncertainty about the potential impact of immunotherapy in the context of COVID-19 (LUO et al., 2020).

Materials and Methods

Samples selection and characterization

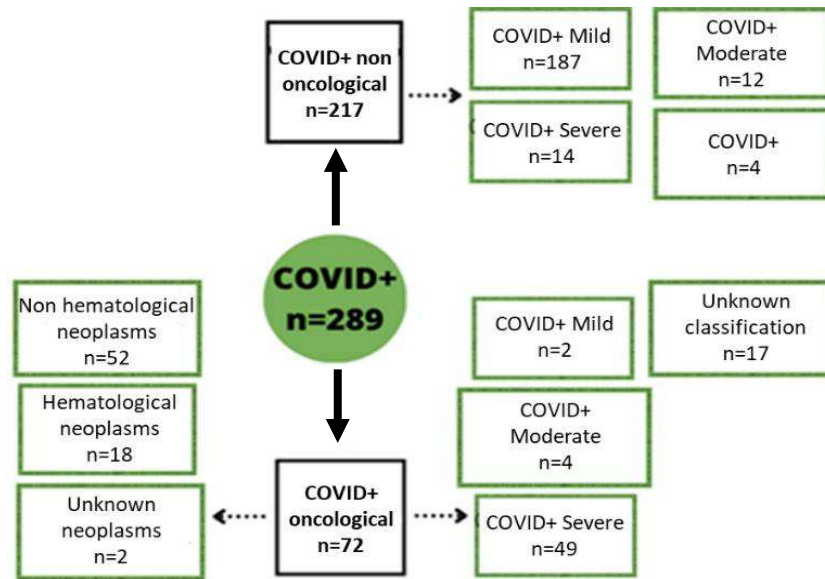
This study was approved by the Institutional Ethics Committee Involving Humans of the State University of Londrina, CAAE No. 36247920.1.0000.5231 and by the Curitiba Ethics Committee, Erasto Gaertner Hospital, Paraná League for the Fight against Cancer CAAE No. 31592620.4.1001.0098. All sample collections and experimental conducts were carried out in accordance with Brazilian guidelines and regulations. The procedures were explained to all participants, and the written consent was obtained prior to the material collection.

In this study, 289 COVID-19 positive peripheral blood samples were collected, whose patients were evaluated for SARS-CoV-2 infection by Real Time PCR (RT-PCR) by Corman et al protocol, together with patients' symptoms data collection.

Figure 1 represents characterization of 289 positive samples for COVID-19, which among the 72 oncological patients, 52 present solid or non-hematological neoplasms, 18 diagnosed with hematological neoplasms, in moderate and severe states of infection by SARS-CoV-2 and 2 of unknown oncological character, but in a mild state of infection; in the non-cancer group, 217 donors with no history of current or previous cancer, stratified into 187 in mild COVID-19 status, 12 in moderate, 14 in severe and 4 in an unknown status for infection.

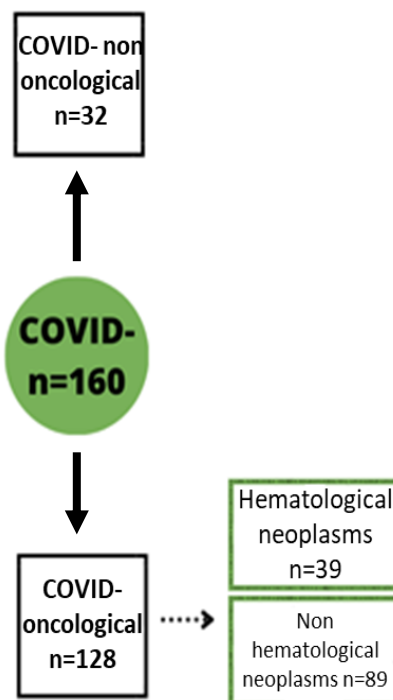
Figure 2 represent characterization of 160 samples negative for COVID-19, which 32 are represented by patients without a history of neoplasms and 128 from patients with tumors of different subtypes, divided into 39 hematological and 89 non-hematological neoplasms.

Figure 1– Characterization of positive samples for COVID-19 disease (COVID+).



COVID+: Positive samples for the Real-Time PCR test, **n**: number of data from a population.

Figure 2– Characterization of samples negative for COVID-19 disease (COVID-).



COVID-: Negative samples for the Real-Time PCR test, **n**: number of data from a population.

The criteria for the classification of patients involved in this study followed the systematization of World Health Organization (WHO), which established, for the year 2020, the management of mild, moderate and severe COVID-19 and the study established by Williamsom and collaborators (2020), in which hematologic neoplasms were considered separately from other cancers in order to reflect on their immunosuppression. After the adoption and validation of these factors, they were classified into patients ranging from mild, moderate and severe to SARSCoV-2 infection and stratified into donors with no history of neoplasms or patients with cancer (non-hematological or hematological malignancy) (WILLIAMSON et al., 2020).

Peripheral blood and DNA obtaining

Peripheral blood (4-5mL) was collected with EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), and DNA samples were obtained using the Biopur Mini Spin kit (Biometrix Diagnóstica® Curitiba, Parana, Brazil) following instructions, quantified by spectrophotometry in a device NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, USA) at 260/280nm wavelengths to assess the degree of purity and stored at suitable temperatures for later use in molecular analysis.

***PDCD1* genotyping**

The genetic polymorphism analysis was performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan fluorescent probes (VIC™ or FAM™) for the *PDCD1* gene 7209 C>T, rs41386349 in intron 4.

The amplification reactions were performed with 2X TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) (stored at 4°-8°C), containing dNTP, Mg²⁺, buffer, Taq DNA polymerase, ROX; 40X TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems) (stored at -20°C), comprised of forward and reverse primers, and highly specific hydrolysis (MGB) probes, ultrapure water for PCR, and approximately 1.1ng/μL of DNA; The fluorescence levels of the PCR products were evaluated in real time by the Step One thermocycler (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Association analyses, for the case–control study, were performed by calculating the Odds Ratio (OR). For the individual polymorphisms, the following genetic models were tested, genotypic (variant heterozygotes against wild homozygotes), dominant (variant heterozygotes and homozygotes against wild homozygotes) and recessive (variant homozygotes against wild homozygotes and heterozygotes). Association analyses with clinical parameters were performed using the Chi-square test, testing the association models against categorized clinical parameters. The Kendall's Tau-b correlation coefficient was then performed to trace the trend of possible correlations between genetic and clinical variables. All statistical tests were performed using GraphPad Prism software version 8.0.0 (San Diego, California, USA) and SPSS Statistics version 17.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA), adopting a significance level of $p < 0.05$.

Results

Impact of SARS-CoV-2 infection and presence of neoplasms on clinical outcome

First, it was verified whether there was a correlation between SARS-CoV-2 infection and clinical evolution in cancer patients (n=72) and patients without the infection (n=128). It was found that cancer patients affected by infection have worse clinical evolution, with a possible outcome of death, than non-infected patients (Tau-b = 0.228; p=0.001).

In the correlation analysis between the presence of cancer and the number of days elapsed between diagnosis and hospital discharge in COVID-19 (COVID⁺) cancer patients (CANCER⁺) was 11 days (Md= 11) and in COVID⁺ non-cancer (CANCER⁻) patients was 9 days (Md= 9), we found a positive correlation, where COVID⁺ cancer patients took longer to be discharged (Tau-b = 0.122; p=0.031). From now on, these samples will be referred to as COVID⁺/COVID⁻ and CANCER⁺/CANCER⁻ to facilitate description and understanding.

In accordance with this result, patients COVID⁺/CANCER⁺ also died earlier compared to CANCER⁻ patients (Tau-b = -0.157; p=0.028) (Table 1).

In the stratification based on groups of hematological (n=57) and non-hematological (n=141) neoplasms with SARS-CoV-2 infection, although we found a trend of correlation between hematological cancer and COVID⁺ poor prognosis, there was no statistically significant difference (Tau-b = 0.473; p=0.050). There was no correlation between COVID⁺/CANCER⁺ patients (n=198) had prognosis (Tau-b = -0.093; p=0.213).

Table 1. Correlation analyses between SARS-CoV-2 infection in cancer patients.

Clinical outcomes	Oncological	
	COVID-positive	COVID-negative
Hospital discharge (N/%)	33 (47,8%)	88 (71,5%)
Death (N/%)	36 (52,2%)	35 (28,5)
	p=0,001*; τ =0,228	
Hospitalization days (mean/sd)	8,9 (7,9)	10,4 (6,9)
	p=0,031*; τ =0,122	
Survival days (mean/sd)	12,1 (2,5)	13,4 (16,0)
	p=0,028; τ =-0,157	

SD: Standart Deviation. Data were expressed as absolute number (N) and percentage (%). *The significance level adopted was $p < 0,05$ and bold values are highlighted (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

***PDCD1* genetic polymorphism and susceptibility to SARS-CoV-2 infection in oncological and non-oncological patients**

The next step of the work was to carry out a case-control study, evaluating the polymorphism in the *PDCD1* gene considering SARS-CoV-2 infection. No association was found; even including cancer and non-cancer patients (Table 2).

Table 2. Case-control association study between the *PDCD1* 7209 C>T genetic polymorphism and SARS-CoV-2 infection between groups of COVID+ / COVID- non-oncological patients and COVID+ / COVID- patients regardless of the malignant neoplasms presence.

Genotype	n=217 (%)	n=32 (%)	OR	CI 95%	p value*
	COVID+/ CANCER	COVID-/ CANCER-			
CC	177 (81.6)	24 (75.0)	--	--	--
7209 C>T	CT	8 (25.0)	0.627	0.259 – 1.445	0.326
	CT+TT	8 (25.0)	0.678	0.284 – 1.551	0.470
Genotype	n=289 (%)	n=160 (%)	OR	CI 95%	p value*
	COVID+	COVID-			
CC	232 (80.3)	124 (77.5)	--	--	--
7209 C>T	TT	1 (0.6)	2.138	0.349 – 26.350	0.662
	CT	35 (21.9)	0.809	0.507 – 1.290	0.387
	CT+TT	36 (22.5)	0.846	0.524 – 1.371	0.543

OR: Odds Ratio; **CI:** confidence interval.

*calculated by the qui squared test or the Fisher exact test when appropriated

It was also verified that *PDCD1* polymorphism is not correlated with infection. Therefore, even in oncological patients the *PDCD1* polymorphism neither was correlated with SARS-CoV-2 virus infection (Tau-b = -0.028; p=0.553).

Analysis of association between *PDCD1* genetic polymorphism with COVID-19 and cancer by gender

When stratifying the group of patients by gender, there was no association of allelic variants with infection (Tau-b = 0.064; p= 0.497 and Tau-b = -0.005; p=0.955). Even not considering cancer patients, performing the correlation only between the COVID⁺/CANCER⁻ group, there was also no significant association between *PDCD1* polymorphism with infection, in males (Tau-b = 0.608; p= 0.608) nor in females (Tau-b = 0.110; p=0.341).

The association of *PDCD1* polymorphism in relation to COVID-19 severity was evaluated, stratifying patients into mild, moderate and severe. There was no statistically significant difference between the evaluated groups (Table 3).

Table 3. Case-control association study between the 7209 C>T genetic polymorphism and the worsening of SARS-CoV-2 infection among groups of COVID⁺ Severe and Moderate / COVID⁺ Mild non-oncologic patients and COVID⁺ Severe and Moderate / COVID⁺ Mild patients regardless of presence of malignant neoplasms.

	Genotype	n= 26 (%)	n= 187 (%)	OR	CI 95%	p value*
		COVID ⁺ Moderate/Severe non oncological	COVID ⁺ Mild non oncological			
7209 C>T	CC	20 (76.9)	153 (81.8)	--	--	--
	CT	6 (23.1)	31 (16.6)	1.48 1	0.558 – 3.978	0.417
	CT+TT	6 (23.1)	34 (18.2)	1.35 0	0.513 – 3.577	0.592
	Genotype	n= 78 (%)	n= 189 (%)	OR	CI 95%	p value*
		COVID ⁺ Moderate/Severe oncological	COVID ⁺ Mild oncological			
7209 C>T	CC	62 (79.5)	155 (82.0)	--	--	-
	CT	15 (19.2)	31 (16.4)	1.21 0	0.618 – 2.405	0.595
	CT+TT	16 (20.5)	34 (18.0)	1.17 6	0.615 – 2.250	0.610

OR: Odds Ratio; **CI:** confidence interval.

*calculated by the qui squared test or the Fisher exact test when appropriated

Aggravation of SARS-COV-2 infection in oncological and non-oncological patients regarding PDCD1 polymorphism

In accordance with previous result, the correlation analysis of the *PDCD1* polymorphism with the severity of SARS-CoV-2 infection, including oncologic and COVID⁺/CANCER⁻ patients (n=289), the allelic variants of the polymorphism were not correlated with the severity of the infection (Tau-b = 0.015; p=0.646), even excluding cancer patients and keeping the non-oncological group COVID⁺ (n=217), we also did not obtain a significant *p* value (Tau-b = 0.075; p=0.319).

Aggravation of SARS-COV-2 infection in oncological and non-oncological patients considering gender

Although no significant in the chi-square test, the number of critically male patients was higher, when we stratified the samples by gender, the SARS-CoV-2 infection worsening, including CANCER⁺ and COVID⁺/CANCER⁻ patients (n=248), was positively correlated with male gender (Tau-b = 0.173; p=0.005). It was also observed that the infection worsening was positively correlated with male gender, even excluding cancer patients (Tau-b = 0.187; p=0.010).

Discussion

This study demonstrated that cancer patients affected by infection have worse clinical evolution, with a possible outcome of death, than non-infected patients. In this context, several studies have highlighted the impact of COVID-19 pandemic on cancer patients. Ruan et al. (2020) showed that, among patients who died from COVID-19, 63% had an underlying disease, mostly cancer, while 41% of patients who were discharged did not (RUAN et al., 2020). Corroborating findings of increased mortality due to COVID-19 in cancer patients, in a prospective, observational multicenter study of 105 cancer patients and 536 cancer-free controls, both COVID-19 positive and age-matched groups, reported that cancer patients had higher death rates, admission to intensive care units (ICU), developing at least one severe or critical symptom and need for mechanical ventilation (DAI et al., 2020).

It was found that cancer patients affected by SARS-CoV-2 infection had significant worse clinical evolution than non-infected patients. It has been verified that in COVID-19, clinical parameters can range from mild flu symptoms to life-threatening respiratory failure. Incubation has a mean period of 5–6 days, while the period between the onset of infection and hospitalization has been reported to be 7 days, and respiratory deterioration 8 and admission into the ICU 10 days (Wang et al., 2019; Yang et al., 2020). Cancer and non-cancerous patients appear to have similar infection rates, but overall, it is assumed that cancer patients are at increased risk of severe COVID-19 and death due to COVID-19 (Liang et al., 2020; He et al., 2020).

Results from R uthrich et al., (2021) remark cancer patients as a group at higher risk due to advanced age and pre-existing conditions. Also, it has been reported that recent cytotoxic therapy may be associated with increased risk of mortality (Grivas et al., 2021).

Lee et al., (2021) reported that patients with hematological malignancies presented an increased susceptibility to viral infections. In this context, it has been demonstrated that patients with COVID-19 shown a differential prognosis depending on the subtype of cancer, where breast cancers have a better prognosis and hematologic cancers have a low survival rate. Whereas hormone therapy has been associated with reduced risk of mortality and low survival hematologic cancers (Sharafeldin et al., 2021). However, in our stratified samples for hematologic cancer, we did not find any association with the adopted parameters. In this context, a study

with a larger sample size is necessary to assess this association.

Pestana et al. (2020) performed a retrospective study of medical records from 24 patients diagnosed with solid cancer and hematological malignancies with respiratory symptoms at Einstein Family Dayan-Daycoval Oncology and Hematology Center (São Paulo, Brazil) in March 2020. Only 3 cases of COVID-19 occurred in patients with hematologic malignancies, none of which was under active treatment. In this context, it has been argued that studies are needed to assess SARS-CoV-2 infection in patients with solid and hematological malignancies presenting respiratory symptoms, as this can unequivocally evolve within the current scenario of the pandemic.

In the present study, there was no association between *PDCD1* genetic polymorphism and susceptibility to SARS-CoV-2 infection in cancer and non-cancer patients.

In patients with COVID-19, the CD8⁺ T cell population undergoes qualitative and quantitative changes. Lymphopenia preferentially affects CD8⁺ T cells (MATHEW et al., 2020; MAZZONI et al., 2020), and low numbers of CD8⁺ T cells are found in severe disease states (CHEN et al., 2020; MAZZONI et al., 2020), CD8⁺ T cells from bronchoalveolar lavage fluid from critically ill patients also exhibited a lack of dominant clones compared to patients with mild COVID-19 (LIAO et al., 2020). In addition, a few studies have reported a depleted CD8⁺ T cell phenotype in severe disease, with increased expression of inhibitory receptors, particularly PD-1 (DE BIASI et al., 2020; DIAO et al., 2020; SONG et al., 2020; ZHENG et al., 2010). However, it is unclear whether PD-1⁺ CD8⁺ T cells are actually depleted or activated in patients with COVID-19 (RHA et al., 2020).

Wang et al. (2006) showed that the occurrence of the C allele is correlated with a decrease in PD-1 expression. However, Mostowska et al. and Zheng et al. observed that the T allele was predominant in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and viral infections, respectively, leading to the hypothesis that the T allele causes lower transcriptional activity of PD-1 in human T cells (MOSTOWSKA et al., 2008; ZHENG et al., 2020). Such divergence observed in the occurrence of different alleles may be related to population variations, which may or may not be related to autoimmune diseases (PROKUNINA et al., 2002; FERREIROS-VIDAL et al., 2004) and various types of cancer (SALMANINEJAD et al., 2017).

When stratifying the group of patients by gender, there was no

association of allelic variants with SARS-CoV-2 infection. The association of *PDCD1* polymorphism in relation to the severity of COVID-19 was evaluated, stratifying patients into mild, moderate, and severe COVID, returning no statistically significant difference between the evaluated groups.

There was no correlation of allelic variants of the *PDCD1* polymorphism with infection severity, including oncological and non-oncological COVID+ patients, as well as including only non-oncological COVID+ patients.

Some studies have investigated the occurrence and correlation of PD-1 blockade on COVID-19 severity in cancer patients, but overall there was no significant difference in severity regardless of exposure to PD-1 blockade (Lou et al., 2020). According to Moore et al. (2020), PD-1 blockade could increase the overactive immune phase of COVID-19 and lead to a worse clinical outcome of the results. Alternatively, blocking PD-1 would lead to an improvement in infection outcomes by increasing immune control of viral infections (KORALNIK et al., 2019). However, in our study we did not obtain clinical data about chemotherapy treatments and cancer stages of patients.

In the correlation between gender and the SARS-CoV-2 infection worsening, with oncologic and non-oncologic COVID+ patients, males had a significant positive correlation. Sexual dimorphism in COVID-19 is not new, as men and women respond differently to viral infections (Ghosh et al., 2017; Klein et al., 2016). In this context, it is suggested that the high morbidity and lethality associated with males is a multifactorial phenomenon, which includes both biological sex variations, such as chromosomal and sex steroid variations, and specific risk habits related to sex, such as smoking, alcoholism, and a higher degree of comorbidity among men (Bots et al., 2017; Gebhard et al., 2020; Reitisma et al., 2017).

Studies have already shown that SARS-CoV-2 primarily binds to host cells by ACE2, widely present in various human tissues. In the respiratory system it is distributed mainly in the nasosinusal cavity regions and on the surface type II alveolar cells, in which human transmembrane serine protease II (TMPRSS2), a cofactor for virus entry, has been localized (Hoffmann et al., 2020; Bezara et al., 2020). The expression of ACE2 is a risk factor for COVID-19 infection (Chua et al., 2020), already identified in pathological findings of tissues affected by the infection (Nie et al., 2021). Interestingly, Bao et al. (2020) observed that male patients have higher expressions of ACE2 in the lungs, which may explain the difference in severity of

COVID-19 disease between different genders.

Androgens, such as testosterone and dihydrotestosterone, are steroid hormones produced by both sexes, but which are present at higher levels in men than in women and are hypothesized to play a role in the pathogenesis of COVID-19 (Channappanavar et al., 2017; Wambier et al., 2020). Circulating androgens bind to androgen receptors and promote their activation, which act as regulators of TMPRSS2, being able to increase its transcription. Thus, a greater number of host cells become susceptible to infection (Mohamed et al, 2021).

According to Bienvenu et al (2020), the immune response developed against infection differs between the sexes, notably, many genes important for immune responses are found on the X chromosome, including some involved in the assembly of innate and adaptive immune responses against viral infections, for example, pattern recognition receptors, costimulatory molecules, and transcription factors (Schurz et al., 2019; Snell et al., 2018). It is suggested that antiviral responses and viral clearance, mediated by the high expression of Toll Like 7 receptors (TLR7) and consequent increased production of type I IFN, occur in an increased way in women and may be one of the mechanisms that justify the lower susceptibility to severity observed among women compared to men in COVID-19 (Bienvenu et al., 2020; Martin et al., 2019; Sarmiento et al., 2019; Webb et al., 2019).

In addition, this fact is related to the increased presence of dendritic cells in women, which is also attributed to genetic and hormonal mechanisms (Laffont et al., 2014; Seillet et al., 2012).

The study by Takahashi et al. (2020) evaluated the differences in the immune response to COVID-19 between genders and found that female patients had more CD4⁺ and CD3⁺ monocytes, mature T cells and differentiated CD8⁺ T lymphocytes, while male patients had a poor CD8⁺ T lymphocyte response in disease progression. In this context, the immune system would have disadvantages in detecting pathogens, with T-cell mediated immunity less robust in male patients, resulting in worse outcome and greater innate cytokine activity in female patients (Metcalf et al., 2020).

The immune profile from patients has been highlighted in clinical practice, although more studies are needed, we can suggest that the male immune system may also explain the divergent risks related to SARS-CoV-2 infection.

Finally, this study demonstrated that cancer patients affected by

SARS-CoV-2 have a worse clinical course and death outcome than uninfected patients. There was no association between *PDCD1* polymorphism and susceptibility to SARS-CoV-2 infection nor to COVID-19 worsening in patients with and without cancer. Oncological and non-cancer COVID+ patients, male sex had a significant positive correlation, with a worse prognosis.

Conflict of Interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Londrina State University Coordination for Post-Graduation (PROPPG-UEL). The authors wish to express their gratitude to Fundação Araucária do Paraná and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- ADDEO, A. e FRIEDLAENDER, A. Cancer and COVID-19: Unmasking their ties. **Cancer Treatment Reviews**, v. 88, 2020.
- AHMADZADEH M., *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 114, p. 1537-44, 2009.
- American Society of Clinical Oncology. COVID-19 Vaccines & Patients with Cancer. Available online: <https://www.asco.org/asco-coronavirus-resources/covid-19-vaccines-patients-cancer> (accessed on 19 March 2022).
- ASANO, T., BOISSON, B., ONODI, F., *et al.* X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. **Science Immunology**, v. 6, n. 62, 2021.
- BAO, W., *et al.* Factors Associated with the Expression of ACE2 in Human Lung Tissue: Pathological Evidence from Patients with Normal FEV₁ and FEV₁/FVC. **J Inflamm**, v. 14, p. 1677-87, 2021.
- BEZARA, O., *et al.* Heterogeneous expression 1 of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. **EBioMedicine**, 2020.
- BIENVENU, L. A. *et al.* Higher mortality of COVID-19 in males: sex differences in immune response and cardiovascular comorbidities. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 14, p. 2197-2206, dez. 2020.
- BOTS, S. H.; PETERS, S. A.; WOODWARD, M. Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality: a global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. **BMJ Global Health**, v. 2, n. 2, mar. 2017.
- BROOKS, D. G., *et al.* Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo, **Nat. Med**, v. 12, n. 11, p. 1301-09, 2006.
- CARRENO, B. M. e COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for co-stimulation and inhibition of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 29-53, 2020.
- CHANNAPPANAVAR, R. *et al.* Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. **Journal of Immunology**, v. 198, n. 10. p. 4046-4053, maio. 2017.
- CHEN, N., *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-13, 2020.
- CHUA, R. L., *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nat Biotechnol**, v. 38. n. 8, p. 970-79, 2020.
- CHUN, J. Y., *et al.* Cancer Patients' Willingness to Take COVID-19 Vaccination: A

Nationwide Multicenter Survey in Korea. **Cancers**, v. 13, n. 15, 2021.

COLONNA, G., TRINCHIERI, e Y. J. LIU, Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat. Immunol**, v. 5, p. 1219–26, 2004.

DAI, M., *et al.* Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-COV- 2: a multi-center study during the COVID-19 outbreak. **Cancer Discovery**, 2020.

DE BIASI, S., *et al.* Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nat. Commun**, v. 11, n. 3434, 2020

DIAO, B., *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Front. Immunol**, v. 11, n. 827, 2020.

European Society of Medical Oncology. ESMO Statements for Vaccination against COVID-19 in Patients with Cancer. Available online: <https://www.esmo.org/covid-19-and-cancer/covid-19-vaccination> (accessed on 19 March 2022).

FABRICE BARLESI, S. F., *et al.* Outcome of cancer patients infected with COVID-19, including toxicity of cancer treatments. **AACR**, 2020.

FREEMAN, G. J., *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027–34, 2000.

FERREIROS-VIDAL, I., GOMEZ-REINO, J. J., BARROS, F., *et al.* Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 8, p. 2590–97, 2004.

GEBHARD, C. *et al.* Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. **Biology of Sex Differences**, v. 11, n. 29, maio. 2020.

GHOSH, S.; KLEIN, R. S. Sex Drives Dimorphic Immune Responses to Viral Infections. **Journal of Immunology**, v. 198, n. 5, p. 1782-1790, mar. 2017.

GRIVAS, P., *et al.* Association of clinical factors and recent anti-cancer therapy with COVID-19 severity among patients with cancer: A report from the COVID-19 and Cancer Consortium. **Ann Oncol**, v. 32, p. 787-800, 2021.

GILLIET, M., CAO, W. e LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: Sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nat. Rev. Immunol**, v. 8, p. 594–606, 2008.

GOSAIN, R., *et al.* COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review. **Current Oncology Reports**, 2020.

GRIFONI, A., *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, p. 1489–1501, 2020.

HE, W., *et al.* COVID- 19 in persons with haematological cancers. **Leukemia**, v. 34, n. 6, p. 1637– 1645, 2020.

- HOFFMANN, M., *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–80 2020.
- JIA, L., *et al.* Impact of PD-1 Blockade on Severity of COVID-19 in Patients with Lung Cancers. **Cancer Discov**, v. 10, n. 8, p. 1121-28, 2020.
- JI, M., *et al.* PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. **J Transl Med**, v. 13, n. 5, 2015.
- KEIR, M. E. *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677–704, 2008.
- KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626-38, ago. 2016.
- KORALNIK, I. J. Can immune checkpoint inhibitors keep JC virus in check? **N Engl J Med**, v. 380, p. 667–68, 2019.
- LAFFONT, S. *et al.* X-Chromosome complement and estrogen receptor signaling independently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN- α production of plasmacytoid dendritic cells from women. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 5444-52, dez. 2014.
- LATCHMAN, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 261-8, 2001.
- LE BERT, N., *et al.* SARS-CoV 2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. **Nature**, v. 584, p. 457–462, 2020.
- LEE, L. Y. W., *et al.* COVID-19 prevalence and mortality in patients with cancer and the effect of primary tumour sub-type and patient demographics: a prospective cohort study. **Lancet Oncol**, v. 21, n. 10, p. 1309–16, 2020.
- LEE, S. H., *et al.* Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. **Arthritis Res Ther**, v. 8, p. R163, 2006.
- LIANG, W., *et al.* Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **Lancet Oncol**, v. 21, n. 3, p. 335–37, 2020.
- LIAO, M., *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nat. Med**, v. 26, p. 842–44, 2020.
- LUO, J., *et al.* Impact of PD-1 Blockade on Severity of COVID-19 in Patients with Lung Cancers. **Cancer Discov**, v. 10, n. 8, p. 1121-28, 2020.
- MARTIN, G. V. *et al.* Mosaicism of XX and XXY cells accounts for high copy number of Toll like Receptor 7 and 8 genes in peripheral blood of men with Rheumatoid Arthritis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 12880, set. 2019.
- MATHEW, D., *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, 2020.

- MAZZONI, A., *et al.* Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. *J. Clin. Invest*, v. 130, p. 4694–4703, 2020.
- MCADAM, A. J., SCHWEITZER, A. N. e SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol. Rev*, v. 165, p. 231–47, 1998.
- MEHTA, V., *et al.* Fatality rate of cancer patients with COVID-19 in a New York hospital system. *Cancer Discovery*, 2020.
- MOORE, B. J. B.; e JUNE, C, H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, v. 368, p. 473–4, 2020.
- MOHAMED, M. S.; MOULIN, T. C.; SCHIÖTH, H. B. Sex differences in COVID-19: the role of androgens in disease severity and progression. *Endocrine*, v. 71, n. 1, p. 3-8, nov. 2021.
- MOSTOWSKA, M., *et al.* The programmed cell death 1 gene 7209 C>T polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 26, p. 457-60, 2008.
- National Comprehensive Cancer Network. Recommendations of the NCCN COVID-19 Vaccination Advisory Committee. Available online: https://www.nccn.org/docs/default-source/covid-19/2021_covid-19_vaccination_guidance_v2-0.pdf (accessed on 19 March 2022).
- NEEL, B. G.; GU, H. e PAO, L. The Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, v 28, p. 284-93, 2003.
- NIE, X, *et al.* Multi-organ proteomic landscape of COVID–19 autopsy. *Cell*. v. 184, n. 3, p. 775-91, 2021.
- NISHIGA, M.; WANG, D. W.; HAN, Y.; LEWIS, D. B.; WU, J. C. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nature Reviews Cardiology*, v. 17, n. 9, p. 543-558, 2020.
- PENN, I. e STARZL, T. E. Immunosuppression and cancer. **Transplantation proceedings: NIH**, p. 943, 1973.
- PESTANA, R. C., *et al.* COVID-19 incidence and outcomes among patients with respiratory symptoms in a cancer center emergency department. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 16, 2020.
- PLANES, R. *et al.* HIV-1 tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha-and toll-like receptor 4-mediated mechanisms. *J. Virol*, v. 88, n. 12, p. 6672-89, 2014.
- POEPPL, W., *et al.* Influenza vaccination perception and coverage among patients with malignant disease. *Vaccine*, v. 33, p. 1682–1687, 2015.
- PROKUNINA, L. *et al.* A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genetics*, v. 32, n. 4, p. 666-9, 2002.

RABI, F. A.; AL ZOUBI, M. S.; KASASBEH, G. A.; SALAMEH, D. M. *et al.* SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

REITSMA, M.B. *et al.* Smoking prevalence and attributable disease burden in 195 countries and territories, 1990-2015: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 389, n. 10082, p. 1885-1906, maio. 2017.

REIZIS, B. Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function. **Immunity**, v. 50, p. 37–50, 2019.

RHA, M. S., *et al.* PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 44-52, 2021.

RICHMAN, D. D., *et al.* Clinical virology. **John Wiley & Sons**, 2016.

ROBILOTTI E. V., *et al.* Determinants of Severity in Cancer Patients with COVID-19 Illness. **MedRxiv**, v. 05, 2020.

RUAN, Q., *et al.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Med**, p.1–3, 2020.

RÜTHRICH, C. M. M., *et al.* COVID-19 in cancer patients: clinical characteristics and outcome—an analysis of the LEOSS registry. **Ann Hematol**, v. 100, n. 2, p. 383-93, 2021.

SALMANINEJAD, A., KHORAMSHAHI, V., AZANI, A., *et al.* PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 70, n. 2, p. 73–86, 2017.

SARMIENTO, L. *et al.* Copy number of the X-linked genes TLR7 and CD40L influences innate and adaptive immune responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 90, n. 2, ago. 2019.

SCHURZ, H. *et al.* The X chromosome and sex-specific effects in infectious disease susceptibility. **Human Genomics**, v. 13, n. 2, p. n. jan. 2019.

SEILLET, C. *et al.* The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor α signaling. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 454-64, jan. 2012.

SHARAFELDIN, N., *et al.* Outcomes of COVID-19 in Patients With Cancer: Report From the National COVID Cohort Collaborative (N3C). **J Clin Oncol**, v. 39, p. 2232-46, 2021.

SHARPE, A. H.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. e FREEMAN, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol**, v. 8, p. 239-245, 2007.

SHI, Y., *et al.* COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ**, v. 27, n. 5, p. 1451-54, 2020.

- SNELL, D. M.; TURNER, J. M. A. Sex Chromosome Effects on Male-Female Differences in Mammals. **Current Biology**, v. 28, n. 22, p. 1313-1324, nov. 2018.
- SONG, J. W., *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nat. Commun**, v. 11, n. 3410, 2020.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R., *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021.
- SYN, N. L., *et al.* De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 12, p. e731–41, 2017.
- TAKAHASHI, T., *et al.* Sex differences in immune responses to SARS-CoV-2 that underlie disease outcomes. **Preprint at medRxiv**, 2020.
- TAY, M. Z.; POH, C. M.; RENIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.
- TSENG, C. C. *et al.* Genetic and epigenetic alteration of the programmed cell death 1 in rheumatoid arthritis. **Eur J Clin Invest**, v. 49, n. 10, p. e13094, 2019.
- UEDA, M., *et al.* Managing cancer care during the COVID-19 pandemic: agility and collaboration toward a common goal. **J Natl Compr Canc Netw**, 2020.
- VINOGRAD, I., *et al.* Factors associated with influenza vaccination among adult cancer patients: A case-control study. **Infect**, v. 20, p. 899–905, 2014.
- WAMBIER, C. G. *et al.* Androgen sensitivity gateway to COVID-19 disease severity. **Drug Development Research**, v. 81, n. 7, p. 771-776, maio. 2020
- WANG, D., *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–69, 2020.
- WANG, G., *et al.* Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 7, p. 1209-1223, 2018.
- WANG, S. C., CHEN, Y. J., OU, T. T., *et al.* Programmed Death-1 Gene Polymorphisms in Patients With Systemic Lupus Erythematosus in Taiwan. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 6, p. 506–11, 2006.
- WEBB, K. *et al.* Sex and Pubertal Differences in the Type 1 Interferon Pathway Associate With Both X Chromosome Number and Serum Sex Hormone Concentration. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 3167, jan. 2019.
- WEISKOPF, D., *et al.* Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Sci Immunol**, v. 5, 2020.

- WILLIAMSON, E., *et al.* OpenSAFELY: factors associated with COVID-19- related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. **MedRxiv**, 2020.
- XU, Z., *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.
- YANG, X., *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS- CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospec- tive, observational study. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 5, p. 475–481, 2020.
- ZHANG, J. J., *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, 2020.
- ZHENG, Y. *et al.* Study of the Lymphocyte Change Between COVID-19 and Non-COVID-19 Pneumonia Cases Suggesting Other Factors Besides Uncontrolled Inflammation Contributed to Multi-Organ Injury, 2020.
- ZHENG, L., Li, D., WANG, F., *et al.* Association Between Hepatitis B Viral Burden in Chronic Infection and a Functional Single Nucleotide Polymorphism of the PDCD1 Gene. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 855–60, 2010
- ZHOU, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-73, 2020.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Não foi encontrada uma associação significativa do polimorfismo no gene PDCD1 com a infecção por SARS-CoV-2.
- ✓ A presença de câncer em pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ mostrou correlação positiva com o número de dias transcorridos entre o diagnóstico e a alta hospitalar (Tau-b = 0,122; p = 0,030).
- ✓ Os pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ também apresentaram o desfecho clínico de óbito precoce em comparação aos pacientes CÂNCER⁻ (Tau-b = -0,157; p = 0,028).
- ✓ A piora da infecção por SARS-CoV-2, incluindo pacientes COVID⁺/CÂNCER⁺ e CÂNCER⁻, foi positivamente correlacionada com o sexo masculino (Tau-b = 0,173; p = 0,005).

REFERÊNCIAS

ADDEO, A. e FRIEDLAENDER, A. Cancer and COVID-19: Unmasking their ties. **Cancer Treatment Reviews**, v. 88, 2020.

AHMADZADEH M., *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 114, p. 1537-44, 2009.

American Society of Clinical Oncology. COVID-19 Vaccines & Patients with Cancer. Disponível online: <https://www.asco.org/asco-coronavirus-resources/covid-19-vaccines-patients-cancer> (acessado em 19 de Março de 2022).

ASANO, T., BOISSON, B., ONODI, F., *et al.* X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. **Science Immunology**, v. 6, n. 62, 2021.

BAO, W., *et al.* Factors Associated with the Expression of ACE2 in Human Lung Tissue: Pathological Evidence from Patients with Normal FEV₁ and FEV₁/FVC. **J Inflamm**, v. 14, p. 1677-87, 2021.

BEZARA, O., *et al.* Heterogeneous expression of the SARS-Coronavirus-2 receptor ACE2 in the human respiratory tract. **EBioMedicine**, 2020.

BROOKS, D. G., *et al.* Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo, **Nat. Med**, v. 12, n. 11, p. 1301-09, 2006.

CARRENO, B. M. e COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for co-stimulation and inhibition of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 29-53, 2002.

CHEN, N., *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-13, 2020.

CHUA, R. L., *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nat Biotechnol**, v. 38, n. 8, p. 970-79, 2020.

CHUN, J. Y., *et al.* Cancer Patients' Willingness to Take COVID-19 Vaccination: A Nationwide Multicenter Survey in Korea. **Cancers**, v. 13, n. 15, 2021.

COLONNA, G., TRINCHIERI, e Y. J. LIU, Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat. Immunol**, v. 5, p. 1219-26, 2004.

DAI, M., *et al.* Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-COV- 2: a multi-center study during the COVID-19 outbreak. **Cancer Discovery**, 2020.

DE BIASI, S., *et al.* Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nat. Commun**, v. 11, n. 3434, 2020.

DIAO, B., *et al.* Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Front. Immunol**, v. 11, n. 827, 2020.

American Society of Clinical Oncology. COVID-19 Vaccines & Patients with Cancer. Disponível online: <https://www.asco.org/asco-coronavirus-resources/covid-19-vaccines-patients-cancer> (acessado em 19 de Março de 2022).

FABRICE BARLESI, S. F., *et al.* Outcome of cancer patients infected with COVID-19, including toxicity of cancer treatments. **AACR**, 2020.

FERREIROS-VIDAL, I., GOMEZ-REINO, J. J., BARROS, F., *et al.* Association of *PDCD1* with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 8, p. 2590–97, 2004.

FREEMAN, G. J., *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027–34, 2000.

GILLIET, M., CAO, W. e LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: Sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nat. Rev. Immunol**, v. 8, p. 594–606, 2008.

GOSAIN, R., *et al.* COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review. **Current Oncology Reports**, 2020.

GOSAIN, R., *et al.* COVID-19 and Cancer: a Comprehensive Review. **Curr Oncol Rep**, v. 22, n. 5, p. 53, 2020.

GRIFONI, A., *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, p. 1489–1501, 2020.

GRIVAS, P., *et al.* Association of clinical factors and recent anti-cancer therapy with COVID-19 severity among patients with cancer: A report from the COVID-19 and Cancer Consortium. **Ann Oncol**, v. 32, p. 787-800, 2021.

HE, W., *et al.* COVID-19 in persons with haematological cancers. **Leukemia**, v. 34, n. 6, p. 1637–1645, 2020.

HOFFMANN, M., *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–80 2020.

JIA, L., *et al.* Impact of PD-1 Blockade on Severity of COVID-19 in Patients with Lung Cancers. **Cancer Discov**, v. 10, n. 8, p. 1121-28, 2020.

JI, M., *et al.* PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. **J Transl Med**, v. 13, n. 5, 2015.

KEIR, M. E. *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677–704, 2008.

KORALNIK, I. J. Can immune checkpoint inhibitors keep JC virus in check? **N Engl J Med**, v. 380, p. 667–68, 2019.

LATCHMAN, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 261-8, 2001.

LE BERT, N., *et al.* SARS-CoV 2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. **Nature**, v. 584, p. 457–462, 2020.

LEE, S. H., *et al.* Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. **Arthritis Res Ther**, v. 8, p. R163, 2006.

LEE, L. Y. W., *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**, v. 21, n. 10, p. 1309–16, 2020.

LIANG, W., *et al.* Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **Lancet Oncol**, 2020.

LIAO, M., *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nat. Med**, v. 26, p. 842–44, 2020.

LUO, J., *et al.* Impact of PD-1 Blockade on Severity of COVID-19 in Patients with Lung Cancers. **Cancer Discov**, v. 10, n. 8, p. 1121-28, 2020.

MATHEW, D., *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, 2020.

MAZZONI, A., *et al.* Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **J. Clin. Invest**, v. 130, p. 4694–4703, 2020.

MCADAM, A. J., SCHWEITZER, A. N. e SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. **Immunol. Rev**, v. 165, p. 231–47, 1998.

MEHTA, V., *et al.* Fatality rate of cancer patients with COVID-19 in a New York hospital system. **Cancer Discovery**, 2020.

MOORE, B. J. B.; e JUNE, C, H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science**, v. 368, p. 473–4, 2020.

MOSTOWSKA, M., *et al.* The programmed cell death 1 gene 7209 C>T polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, p. 457-60, 2008.

National Comprehensive Cancer Network. Recommendations of the NCCN COVID-19 Vaccination Advisory Committee. Disponível online: https://www.nccn.org/docs/default-source/covid-19/2021_covid-19_vaccination_guidance_v2-0.pdf (acessado em 19 de Março de 2022).

NEEL, B. G.; GU, H. e PAO, L. The Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. **Trends Biochem Sci**, v 28, p. 284-93, 2003.

NIE, X, *et al.* Multi-organ proteomic landscape of COVID–19 autopsy. **Cell**. v. 184, n. 3, p. 775-91, 2021.

NISHIGA, M.; WANG, D. W.; HAN, Y.; LEWIS, D. B.; WU, J. C. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 9, p. 543-558, 2020.

PENN, I. e STARZL, T. E. Immunosuppression and cancer. **Transplantation proceedings: NIH**, p. 943, 1973.

PESTANA, R. C., *et al.* COVID-19 incidence and outcomes among patients with respiratory symptoms in a cancer center emergency department. **Brazilian Journal of Oncology**, v. 16, 2020.

PLANES, R. *et al.* HIV-1 tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha-and toll-like receptor 4-mediated mechanisms. **J. Virol**, v. 88, n. 12, p. 6672-89, 2014.

POEPPL, W., *et al.* Influenza vaccination perception and coverage among patients with malignant disease. **Vaccine**, v. 33, p. 1682–1687, 2015.

PROKUNINA, L. *et al.* A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, n. 4, p. 666-9, 2002.

RABI, F. A.; AL ZOUBI, M. S.; KASASBEH, G. A.; SALAMEH, D. M. *et al.* SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

REIZIS, B. Plasmacytoid dendritic cells: Development, regulation, and function. **Immunity**, v. 50, p. 37–50, 2019.

RHA, M. S., *et al.* PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific CD8+ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 44-52, 2021.

RICHMAN, D. D., *et al.* Clinical virology. **John Wiley & Sons**, 2016.

ROBILOTTI E. V., *et al.* Determinants of Severity in Cancer Patients with COVID-19 Illness. **MedRxiv**, v. 05, 2020.

RUAN, Q., *et al.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Med**, p.1–3, 2020.

RÜTHRICH, C. M. M., *et al.* COVID19 in cancer patients: clinical characteristics and outcome—an analysis of the LEOSS registry. **Ann Hematol**, v. 100, n. 2, p. 383-93, 2021.

- SALMANINEJAD, A., KHORAMSHAHI, V., AZANI, A., *et al.* PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 70, n. 2, p. 73–86, 2017.
- SHARAFELDIN, N., *et al.* Outcomes of COVID-19 in Patients With Cancer: Report From the National COVID Cohort Collaborative (N3C). **J Clin Oncol**, v. 39, p. 2232-46, 2021.
- SHARPE, A. H.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. e FREEMAN, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol**, v. 8, p. 239-245, 2007.
- SHI, Y., *et al.* COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ**, v. 27, n. 5, p. 1451-54, 2020.
- SONG, J. W., *et al.* Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. **Nat. Commun**, v. 11, n. 3410, 2020.
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R., *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2021.
- SYN, N. L., *et al.* De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 12, p. e731–41, 2017.
- TAKAHASHI, T., *et al.* Sex differences in immune responses to SARS-CoV-2 that underlie disease outcomes. **Preprint at medRxiv**, 2020.
- TAY, M. Z.; POH, C. M.; RENIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.
- TSENG, C. C. *et al.* Genetic and epigenetic alteration of the programmed cell death 1 in rheumatoid arthritis. **Eur J Clin Invest**, v. 49, n. 10, p. e13094, 2019.
- UEDA, M., *et al.* Managing cancer care during the COVID-19 pandemic: agility and collaboration toward a common goal. **J Natl Compr Canc Netw**, 2020.
- VINOGRAD, I., *et al.* Factors associated with influenza vaccination among adult cancer patients: A case-control study. **Infect**, v. 20, p. 899–905, 2014.
- WANG, D., *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–69, 2020.
- WANG, G., *et al.* Kynurenic acid, an IDO metabolite, controls TSG-6-mediated immunosuppression of human mesenchymal stem cells. **Cell Death Differ**, v. 25, n. 7, p. 1209-1223, 2018.

WANG, S. C., CHEN, Y. J., OU, T. T., *et al.* Programmed Death-1 Gene Polymorphisms in Patients With Systemic Lupus Erythematosus in Taiwan. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 6, p. 506–11, 2006.

WEISKOPF, D., *et al.* Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Sci Immunol**, v. 5, 2020.

WILLIAMSON, E., *et al.* OpenSAFELY: factors associated with COVID-19- related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. **MedRxiv**, 2020.

XU, Z., *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.

YANG, X., *et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 5, p. 475–481, 2020.

ZHANG, J. J., *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, 2020.

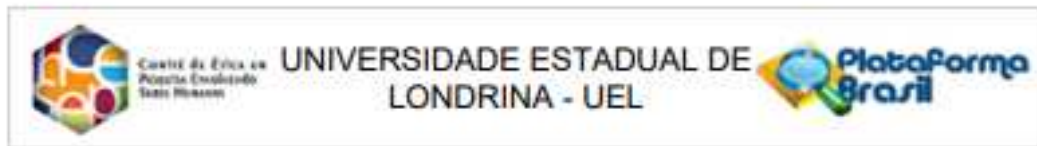
ZHENG, L., Li, D., WANG, F., *et al.* Association Between Hepatitis B Viral Burden in Chronic Infection and a Functional Single Nucleotide Polymorphism of the PDCD1 Gene. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 855–60, 2010.

ZHENG, Y. *et al.* Study of the Lymphocyte Change Between COVID-19 and Non-COVID-19 Pneumonia Cases Suggesting Other Factors Besides Uncontrolled Inflammation Contributed to Multi-Organ Injury, 2020.

ZHOU, P., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-73, 2020.

ANEXOS

ANEXO A
Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade
Estadual de Londrina



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação de fatores imunogenéticos relacionados à resposta imune regulatória na infecção por SARS-CoV-2: associação com o prognóstico, morbidade e mortalidade.

Pesquisador: Karen Brajão de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 36247920.1.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.204.004

Apresentação do Projeto:

De acordo com o documento PB_ Informações Básicas de 06/08/2020

Desenho:

Trata-se de estudo caso-controle, seguido de estudo longitudinal de acompanhamento dos pacientes por 30 dias.

Este é um subprojeto de um projeto maior já aprovado pelo CEP, intitulado "Investigação de fatores genéticos e imunológicos na infecção por SARS-CoV-2: associação com o prognóstico, morbidade e mortalidade", cuja CAAE é 31656420.0.0000.5231, parecer nº 4.053.033.

O envolvimento da resposta imunológica na fisiopatologia e prognóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 ainda não está totalmente estabelecida. Têm sido demonstrado intenso desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em pacientes com doença pulmonar grave ("tempestade de citocinas"), e parece ser diferenciada daquela apresentada por outras infecções respiratórias. Embora fatores como idade e comorbidades pré-existentes estejam diretamente associadas ao pior prognóstico e desfecho clínico de pacientes com COVID-19, casos graves e alta mortalidade também tem ocorrido na ausência destes fatores. Variações nos genes de citocinas podem alterar a sua expressão proteica exercendo assim um papel importante tanto na susceptibilidade como na progressão da COVID-19. Assim o objetivo deste estudo é avaliar a associação de biomarcadores imunogenéticos da resposta anti-inflamatória com o prognóstico e

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Em Saúde
Total Brasileira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 4.204.004

desfecho clínico em pacientes com COVID-19. Trata-se de estudo caso-controle, prospectivo em que serão selecionados 300 participantes alocados em dois grupos: Controle (n=150 indivíduos sem comorbidades, sem evidências clínicas e laboratoriais de doenças infecciosas agudas e/ou crônicas); COVID-19 (n=150, pacientes infectados pelo SARS-CoV-2).

Os participantes serão provenientes do Hospital Universitário de Londrina - PR. Todos os participantes serão avaliados no início do estudo para

obtenção dos dados clínicos, coleta de amostra biológica e determinação dos indicadores de prognóstico.

Os pacientes do grupo COVID-19 serão

reavaliados após 7, 14 e 30 dias para obtenção de dados clínicos: duração de hospitalização, necessidade de UTI, dias em uso de ventilação

mecânica, infecções secundárias, sucesso terapêutico ao tratamento convencional instituído, desfecho clínico (óbito/sobrevivência). Será realizada a

genotipagem dos seguintes polimorfismos dos genes, TGFBR2 (rs308465), TGFB1 (rs1800468, rs1800469, rs1800470, rs1800471), IL10 (rs1800896, rs1800871, rs1800872) e FOXP3(rs2232365 e rs3761548). Os níveis plasmáticos de citocinas (IL-10 e TGF-) serão determinados por imunofluorimetria. Espera-se com este estudo evidenciar a influência destes polimorfismos no desenvolvimento da COVID-19, colaborando assim

para o entendimento da imunopatologia desta doença, fornecendo subsídios para a identificação de pacientes com pior prognóstico e desfecho clínico, possibilitando a implantação de tratamento personalizado com impacto direto na morbidade e mortalidade dos pacientes.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos no estudo indivíduos com diagnóstico confirmado pela técnica de RT-PCR, de SARS-CoV-2 sintomáticos e assintomáticos atendidos no HU-UEL.

Grupo Controle: será constituído por doadores de sangue controlados quanto ao sexo, idade e raça (cor).

Apresentarão sorologia não reagente para

todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, assim como deverão apresentar sorologia negativa para Dengue.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos das análises indivíduos com sorologia positiva para outros vírus, como vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C

(HCV), vírus da hepatite B (HBV), vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II (HTLV I/II), vírus da Dengue e Chikungunya, assim como amostras reagentes para o Trypanosoma cruzi e para

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep266@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa (CER) da
UEL (Londrina)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Protocolo: 4.204.004

o teste não treponêmico para sífilis (VDRL).

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o documento PB_ Informações Básicas de 06/08/2020

Objetivo Primário:

Avaliar biomarcadores genéticos e imunológicos da resposta imune anti-inflamatória associados ao prognóstico, morbidade e mortalidade da doença causada por SARS-CoV-2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o documento PB_ Informações Básicas de 06/08/2020.

Riscos:

Os riscos da pesquisa são relacionados a coleta de sangue periférico, uma vez que a coleta de secreção nasal para diagnóstico de COVID-19 será realizada independentemente do envolvimento do participante na pesquisa.

Assim, há um pequeno risco de hematoma na região da coleta de sangue, bem como de queda de pressão e desmaio. Para minimizar os riscos a coleta será realizada em ambiente hospitalar por profissionais capacitados, e quaisquer riscos que venham a ocorrer, os participantes serão prontamente amparados pela equipe do projeto.

Benefícios:

Os benefícios serão indiretos, uma vez que este estudo permitirá um maior entendimento da imunopatologia da COVID-19, fornecendo subsídios para a identificação de pacientes com pior prognóstico e desfecho clínico, possibilitando a implantação de tratamento personalizado com impacto direto na morbidade e mortalidade dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para área e temática de COVID-19.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou folha de rosto devidamente preenchida e assinada. Apresentou autorização do HU para coleta de dados. Apresentou TCLE em acordo com a resolução. Apresentou declaração de biorrepositório assinado. A coleta de dados está prevista para 08/09, o orçamento é de R\$ 13.900,00 custeado pela própria pesquisadora que destaca que os reagentes já foram adquiridos com recursos de projetos anteriores.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

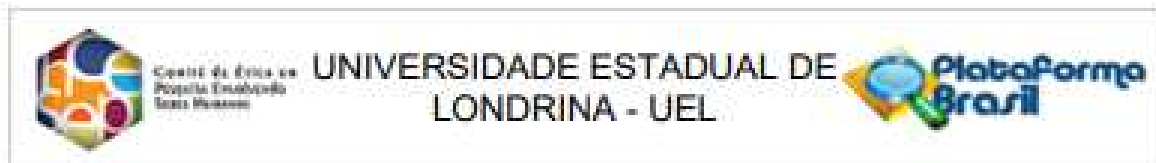
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (41)3571-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep058@uel.br



Continuação do Parecer: 4.254.034

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora faz parte da equipe do projeto "Investigação de fatores genéticos e imunológicos na infecção por SARS-CoV-2: associação com o prognóstico, morbidade e mortalidade", cuja CAAE é 31656420.0.0000.5231 e que foi avaliado e aprovado por este CEP (parecer nº 4.053.033). A coleta de dados dos prontuários, questionário e de sangue será executado pelo projeto maior, sendo que neste projeto a pesquisadora receberá as amostras de sangue para fazer as avaliações dos biomarcadores. Portanto, recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresentá-lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 468/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep058@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Desenvolvida
Sem Prejuízo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 4.204/204

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO_1808049.pdf	06/08/2020 14:57:28		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	06/08/2020 14:58:50	Karen Bração de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	declaracao_Biorrepositorio_COVID_poli morfismos.pdf	06/08/2020 14:58:38	Karen Bração de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	05/08/2020 20:41:53	Karen Bração de Oliveira	Aceito
Outros	AutorizacaoHU_projeto_maior.pdf	05/08/2020 20:30:49	Karen Bração de Oliveira	Aceito
Parecer Anterior	PB PARECER CONSUBSTANCIADO CEP 4053033 projeto maior.pdf	05/08/2020 20:30:22	Karen Bração de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa COVID_produtividade_CEP.pdf	05/08/2020 20:29:08	Karen Bração de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 10 de Agosto de 2020

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

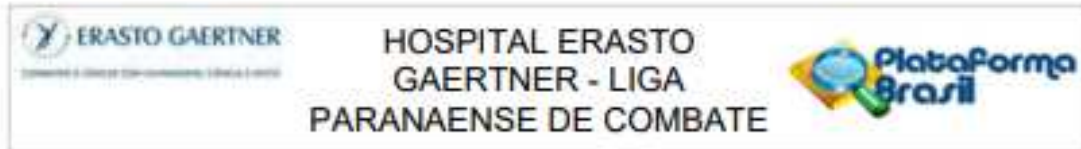
UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5458

CEP: 58.057-070

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO B
Aprovação do comitê de ética em pesquisa de Curitiba, Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco, e desenvolvimento de metodologias laboratoriais para detecção de antígenos e anticorpos relacionados ao SARS-CoV2

Pesquisador: Jeanine Marie Nardin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31592620.4.1001.0098

Instituição Proponente: LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CANCER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.287.113

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.

Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco, e desenvolvimento de metodologias laboratoriais para detecção de antígenos e anticorpos relacionados ao SARS-CoV2. O impacto do COVID-19 em pacientes imunocomprometidos ainda é desconhecido. Evidências acumuladas sugerem que pacientes graves com COVID-19 podem ter uma síndrome citada como "tempestade de citocinas". Compreender como pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas evoluíram frente à infecção é fundamental para determinação do procedimento clínico de suporte terapêutico e manejo de sintomas, bem como para o manejo dos recursos hospitalares. O risco de evolução desfavorável conforme o grau de imunossupressão ou a possibilidade de tais pacientes serem "poupados" da tempestade de citocinas justamente pela imunidade comprometida são pontos que precisam ser elucidados frente a evolução da doença. O estudo tem por objetivo monitorar o perfil de citocinas e imunológico, bem como a carga viral dos pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas com infecção por SARS CoV-2. Serão

Endereço: Rua Dr. Ovidio do Amaral 201

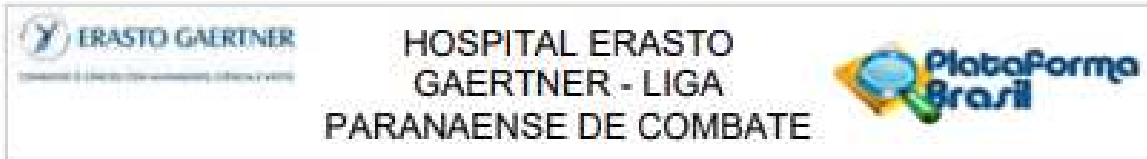
Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: cep@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 4.267.113

incluídos no estudo pacientes adultos e pediátricos com neoplasias malignas sólidas e hematológicas, e como controle pacientes sem câncer. Os centros participantes acompanharão prospectivamente todos os casos suspeitos de COVID-19 que ocorrerem em pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas de 01 de maio de 2020 a 30 abril de 2022. Os pacientes deverão aceitar participar do estudo através de consentimento livre e esclarecido, após aprovação desta proposta pelo Comitê de Ética em Pesquisa das instituições participantes. A perspectiva é incluir 400 pacientes do Hospital Erasto Gaertner (Centro coordenador), 100 paciente da Unidade Guarapuava e Paranaguá do Hospital Erasto Gaertner e 200 pacientes dos centro coparticipantes, conforme série histórica da atual pandemia. Serão considerados casos suspeitos pacientes que se apresentarem tosse, febre, coriza, dor de garganta e dificuldade para respirar. A COVID-19 (infecção comprovada pelo SARS CoV-2) será definida de acordo com os critérios publicados pela OMS. Infecção pelo SARS CoV-2 relacionada a assistência a saúde será definida com base no período de incubação médio do vírus (5 dias). A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) será definida de acordo com as orientações provisórias da OMS para COVID-19. Eventos clínicos graves (desfecho composto) serão definidos como a admissão de uma unidade de terapia intensiva (UTI), o uso de ventilação mecânica ou a morte (necessidade de intubação e ventilação mecânica em 7 dias; necessidade de ventilação mecânica no hospital). Para identificar fatores de risco para mortalidade, tempo de estadia no hospital, mortalidade, complicações tromboembólicas e de disfunção renal (definida como incremento de creatinina acima de 1,5 vezes o valor basal) serão coletados os seguintes dados: sexo, idade, tipo de doença neoplásica, comorbidades, estadiamento de malignidade subjacente, contagem de neutrófilo, linfócitos CD4 e CD8, ferritina, contagem de plaquetas, VHS, dados clínicos do quadro de COVID-19, duração dos sintomas, terapias recebidas no momento da avaliação, necessidade de internação em UTI e ventilação mecânica, superinfecção por outros microorganismos, outras complicações e taxas de letalidade de 48 horas, 7 dias e 30 dias. Será observado também o padrão radiológico do COVID-19 nessa população e uso de terapia de resgate (ventilação não-invasiva ou cânula nasal de alto fluxo) em 7 dias. Para o diagnóstico e carga viral de SARS CoV-2 o RNA dos pacientes será extraído a partir de swab nasofaríngea ou de trato respiratório inferior com o kit Qiamp Viral RNA mini kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O diagnóstico para a presença de COVID19 será realizado pelo protocolo adotado pelo Ministério da Saúde e indicado pela OMS, que consiste em PCR em tempo real (RT-qPCR). A determinação da carga viral do Covid19 será realizada semanalmente até o primeiro exame negativo e melhora dos sintomas (estimativa de 4 testes por paciente), com a utilização do mesmo protocolo de extração e amplificação citados anteriormente. Os exames

Endereço: Rua Dr. Ovidio do Amaral 201

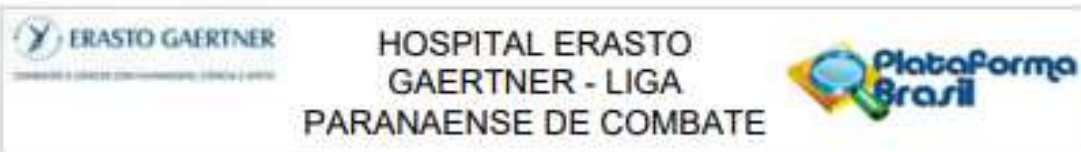
Bairro: Jardim das Américas

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 4.267.113

laboratoriais serão realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas das instituições: hemograma completo com contagem de plaquetas, quantificação de leucócitos CD4 e CD8, IgM, e IgG (testes rápidos para COVID-19), D-dímeros, coagulograma, VHS, proteína C reativa, TGO, TGP, LDH, 25-OH-vitamina D e ferritina. O perfil escolhido para análise de citocinas/quimiocinas incluirá as citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias, especialmente aquelas que já foram relacionadas previamente com a infecção por SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV2, incluindo G-CSF, IFN-, IL-1, IL-1, IL-2R, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-2, MCP-3, IL-10, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 e TNF-. As citocinas serão dosadas em amostras de soro ou plasma. Para a análise de será utilizado método de ensaio imunológico customizado do tipo Luminex (imunensaio multi-análise baseado em micro-esferas). Para avaliar a resposta imunológica do paciente também será avaliada a expressão dos receptores tipo Toll Like em sangue periférico. Acredita-se que os níveis de algumas citocinas serão significativamente alterados em pacientes com SARS e câncer conforme gravidade da doença, vigência da terapia antineoplásica e grau de imunossupressão. Propomos também produzir kits de custo reduzido, quando comparado aos que estão sendo utilizados pelo Ministério da Saúde. Para atingir este objetivo, o kit deverá ser produzido a partir de insumos de baixo custo, preferencialmente nacionais. Ademais, a tecnologia de detecção será um teste de ELISA, em caso de sucesso, pretende-se abarcar a tecnologia também em sensor eletroquímico rápido, para agilizar a geração de resultados semi-quantitativos. Os resultados citados acima serão triados com amostras de soros de pacientes positivos para COVID-19 (diagnóstico por qPCR em laboratórios de atendimento clínico). Estes soros serão comparados com amostras de pacientes negativos para a infecção, bem como de amostras de pacientes positivos para outras infecções respiratórias.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO Monitorar o perfil de citocinas e imunológico, bem como a carga viral dos pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas com infecção por SARS CoV-2. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS-** Identificar a incidência de SARS CoV-2 em pacientes oncohematológicos. Nos pacientes que realizarem TCTH será avaliado a incidência nos 6 meses após o TCTH;- Mensurar os níveis de citocinas inflamatórias nas fases aguda, progressiva e convalescença ou óbito;- Identificar a frequência de infecções assintomáticas de SARS CoV-2;- Determinar os valores de linfócitos CD4 e CD8 em pacientes onco-hematológicos com infecção por SARS Cov-2;- Mensurar o nível de anticorpos específicos pré (basal) e a dinâmica de anticorpos IgM e IgG., bem como a duração de anticorpos;- Avaliar a expressão dos receptores TLRs em sangue periférico;- Monitorar a carga viral dos pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas positivos par SARS Cov-2 e, desta forma monitorar a duração de excreção viral em trato respiratório de

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: csp@erastogaertner.com.br



Continuação do Protocolo: 4.267.113

pacientes com infecção por SARS CoV-2- Caracterizar a presença e a duração da viremia;- Descrever as características clínica e demográficas dos pacientes onco-hematológicos que evoluíram com COVID-19. - Identificar fatores de risco para casos graves (necessidade de intubação e ventilação mecânica) e óbito;- Identificar polimorfismos genéticos nos pacientes como fator de risco para a infecção por SARS CoV-2;- Identificar biomarcadores plasmáticos tipo microRNA para acompanhamento de progressão da doença e associação com outros parâmetros analisados.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS- - Realizar o diagnóstico molecular de COVID-19 por detecção molecular por amplificação isotérmica denominada LAMP (amplificação isotérmica mediada por Loop) em comparação com a técnica padrão-ouro em tempo real da PCR. - Caracterizar o genoma do vírus Sar-CoV-2 isolado dos pacientes incluídos no estudo. - Descrever o padrão radiológico do COVID-19 nessa população; - Ocorrência de complicações tromboembólicas e de disfunção renal; - Descrever o painel basal de citocinas de acordo com tempo pós-TCTH e outros eventos relacionados ao transplante (enxertia, DECH, CMV). - Determinar a sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico imunológicos para COVID-19 baseados em ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e sensores eletroquímicos. - Desenvolver um método de ELISA sanduíche para detectar antígenos do SARS-CoV. - Determinar a precisão dos métodos de diagnóstico imunológicos para detecção de anticorpos contra a proteína N do SARS-CoV-2 em amostras de soro e/ou sangue bruto. - Avaliar com quantos dias após o início dos sintomas os métodos de diagnóstico imunológicos conseguem detectar a presença de anticorpos para COVID-19 no plasma e sangue dos pacientes. - Padronização de uma metodologia baseada em citometria de fluxo para detecção simultânea de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade referente à quebra accidental do anonimato dos dados (perda de confidencialidade), ainda que a equipe de pesquisa se comprometa com a garantia da confidencialidade. Como o estudo aborda ainda a coleta de material biológico para realização de exames há o risco de danos físicos e situações de desconforto com a coleta de sangue e coleta de material de orofaringe. Garantimos que os pesquisadores são habilitados para os métodos de coleta do material reduzindo o desconforto e a probabilidade de complicações, que caso existam serão imediatamente sanadas pela equipe do estudo e pelas instituições envolvidas.

Endereço: Rua Dr. Oyande do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.530-060

E-mail: osp@erastogaertner.com.br



HOSPITAL ERASTO GAERTNER - LIGA PARANAENSE DE COMBATE



Continuação do Parecer: 4.267.113

Benefícios: O COVID-19 é uma importante causa de SARS e óbito, principalmente em pacientes idosos e com comorbidades. Compreender como pacientes com neoplasias malignas sólidas e hematológicas evoluirão frente à infecção é fundamental para determinação do procedimento clínico de suporte terapêutico e manejo de sintomas, bem como para o manejo dos recursos hospitalares. O risco de evolução desfavorável conforme o grau de imunossupressão ou a possibilidade de tais pacientes serem "poupados" da tempestade de citocinas justamente pela imunidade comprometida são pontos que precisam ser elucidados frente a evolução da doença. Acredita-se que os níveis de algumas citocinas serão significativamente alterados em pacientes com SARS e câncer conforme gravidade da doença, vigência da terapia antineoplásica e grau de imunossupressão. Ainda, propomos produzir kits de custo reduzido, quando comparado aos que estão sendo utilizados pelo Ministério da Saúde, com valor estimado de R\$75,00/teste. Para atingir este objetivo, o kit deverá ser produzido a partir de insumos de baixo custo, preferencialmente nacionais. Ademais, a tecnologia de detecção será um teste de ELISA, como já foi demonstrado e avaliado em recente publicação (33). Por fim, em caso de sucesso, pretende-se abarcar a tecnologia também em sensor eletroquímico rápido, para agilizar a geração de resultados semi-quantitativos. Os resultados citados acima serão triados com amostras de soros de pacientes positivos para COVID-19 (diagnóstico por qPCR em laboratórios de atendimento clínico). Estes soros serão comparados com amostras de pacientes negativos para a infecção, bem como de amostras de pacientes positivos para outras infecções respiratórias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente emenda trata-se das seguintes alterações do protocolo:

A – Alteração do título da pesquisa para melhor adequar os novos objetivos. Título alterado de "Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco para desenvolvimento de Síndrome Respiratória Aguda Grave" para "Análise prospectiva de pacientes onco-hematológicos com COVID-19 para caracterização do perfil de citocinas plasmáticas, imunológico, cinética viral e fatores de risco e desenvolvimento de metodologias laboratoriais para detecção de antígenos e anticorpos relacionados ao SARS-CoV2"

B – Atualização da equipe de pesquisa com a inclusão dos pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, que execução os novos objetivos da emenda:

Endereço: Rua Dr. Ovideu do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: cep@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 4.287.113

- Luciano Fernandes Huergo: <http://lattes.cnpq.br/1187599583784902>
- Glaucio Valdameri: <http://lattes.cnpq.br/9897630183923653>
- Breno Castello Branco Beirao: <http://lattes.cnpq.br/5656845885856117>
- Dênio Emanuel Pires Soulo: <http://lattes.cnpq.br/0601403644789424>

C – Acrescentado os novos objetivos secundários do estudo:

- Determinar a sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico imunológicos para COVID-19 baseados em ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e sensores eletroquímicos.
- Desenvolver um método de ELISA sanduiche para detectar antígenos do SARS-CoV.
- Determinar a precisão dos métodos de diagnóstico imunológicos para detecção de anticorpos contra a proteína N do SARS-CoV-2 em amostras de soro e/ou sangue bruto.
- Avaliar com quantos dias após o início dos sintomas os métodos de diagnóstico imunológicos conseguem detectar a presença de anticorpos para COVID-19 no plasma e sangue dos pacientes.
- Padronização de uma metodologia baseada em citometria de fluxo para detecção simultânea de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-COVID-19.

D - Propor novas hipóteses do estudo conforme novos objetivos secundários, a citar:

Será possível identificar pessoas que tiveram contato com o SARS-CoV2 através da identificação das respostas imunes no sangue ou outros fluidos biológicos, como saliva. Estas respostas de anticorpos poderão ser avaliadas pela técnica tradicional de ELISA ou por meio de um biossensor imunoquímico. Será possível desenvolver método de detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-COVID-19 por citometria de fluxo.

E – Ajustar os critérios de inclusão e população do estudo, em **negrito** as adequações:

1. Casos suspeitos e confirmados para SARS Cov-2 atendidos in loco nas instituições participantes. Os testes de diagnóstico para COVID-19 serão realizados pelo estudo, e pacientes que forem atendidos nos centros já com confirmação diagnóstica de infecção por SARS Cov-2

Endereço: Rua Dr. Ovideu do Amaral 201
 Bairro: Jardim das Américas
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: osp@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 4.287.113

deverão repetir os exames conforme protocolos do estudo. Define-se como casos suspeitos os pacientes com febre e pelo menos um sinal ou sintoma respiratório (tosse, dificuldade para respirar, produção de escarro, congestão nasal ou conjuntival, dificuldade para deglutir, dor de garganta, coriza, saturação de O₂ < 95%, sinais de cianose, batimento de asa de nariz, tiragem intercostal e dispnéia), ou paciente oriundo de região endêmica, procedente de viagem para região endêmica nos últimos 14 dias ou em contato com caso suspeito ou confirmado nos últimos 14 dias. Qualquer gravidade de quadro será admitido. Tempo entre início de sintomas e inclusão no estudo deve ser inferior ou igual a 20 dias.

2. Pacientes adultos e pediátricos com neoplasias malignas sólidas e hematológicas, candidatos ou não ao TCTH (coorte A).

3. Pacientes adultos e pediátricos sem neoplasias malignas sólidas e hematológicas (coorte B – controle da coorte A).

4. Pacientes assintomáticos e negativos para o SARS Cov-2 (por teste molecular do tipo PCR) serão incluídos como grupo controle, tanto para o seguimento clínico das coortes A e B, como para a padronização dos testes moleculares e sorológicos desenvolvidos no estudo. Os pacientes do serviço de TCTH assintomáticos, negativos para SARS CoV-2 configurarão a coorte C - controle dos pacientes de TCHT com infecção por COVID-19.

5. Pacientes que aceitarem participar do estudo através de consentimento livre e esclarecido.

6 - Para a validação dos ensaios sorológico também serão utilizadas amostras de sangue (plasma e sangue total) e saliva coletadas antes do período da pandemia e armazenadas nos centros participantes. Para estas amostras solicitamos isenção do TCLE uma vez que os pesquisadores não terão acesso aos respectivos doadores das amostras

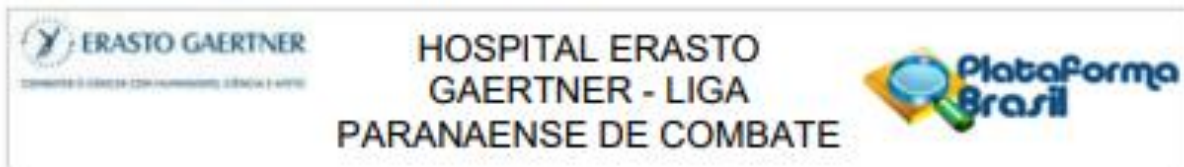
F – Incluir saliva nas análises laboratoriais conforme alterações incluídas no texto do projeto emendado.

G – Atualizado a metodologia para atender novos objetivos do estudo

Endereço: Rua Dr. Ovidio do Amaral 201
 Bairro: Jardim das Américas
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3361-5271

CEP: 81.520-060

E-mail: osp@erastogaertner.com.br



Continuação do Parecer: 4.287.113

H – Atualizado o TCLE para atender aos novos objetivos do estudo.

Documento: SARS-CoV-2/HEG – COVID19_Câncer_Citocinemia_CargaViral. TCLE - V. 2.0 - 15 de agosto de 2020.

Todas as alterações estão destacadas no arquivo em word do projeto emendado anexado à Plataforma Brasil:

SARS-CoV-2/HEG –COVID19_Câncer_Citocinemia_CargaViral. Versão 2_15 de agosto de 2020.

Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto, TCLE, declarações e demais documentos obrigatórios apresentados corretamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está de acordo conforme itens acima analisados, sem lista de inadequações.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_163374_4_E1.pdf	18/09/2020 18:44:01		Aceito
Declaração de Pesquisadores	JustificativaEmenda.docx	18/09/2020 18:40:29	Jeanine Marie Nardin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_citocinemiaV2.docx	18/09/2020 18:39:58	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVID_citocinas_V2_15Ago.docx	18/09/2020 18:39:44	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVID_citocinas_Final.docx	08/05/2020 15:42:10	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Outros	SARSCoV2HEGCOVID19C_CRF.pdf	08/05/2020 15:41:56	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracoes_pesquisador.pdf	08/05/2020 15:41:23	Jeanine Marie Nardin	Aceito

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

CEP: 81.520-060

UF: PR **Município:** CURITIBA

Telefone: (41)3361-5271

E-mail: cep@erastogaertner.com.br

 ERASTO GAERTNER <small>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, CLÍNICA E SAÚDE</small>	HOSPITAL ERASTO GAERTNER - LIGA PARANAENSE DE COMBATE	
--	--	---

Continuação do Parecer: 4.267.113

Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisadores.pdf	08/05/2020 15:40:02	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Orçamento	Orçamento_SARSCoV2_HEG_Diag_Cit ocinas.xls	07/05/2020 17:50:54	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Declaração de concordância	Declaracao_Diretorclinica.pdf	07/05/2020 17:35:39	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Diretortecnico.pdf	07/05/2020 17:35:27	Jeanine Marie Nardin	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_citocinemia.docx	07/05/2020 17:35:10	Jeanine Marie Nardin	Aceito
Folha de Rosto	FRassinada.pdf	07/05/2020 17:33:56	Jeanine Marie Nardin	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 18 de Setembro de 2020

Assinado por:
Olair Carlos Beltrame
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Dr. Ovidio do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA

CEP: 81.530-060

Telefone: (41)3381-5271

E-mail: oep@erastogaertner.com.br