

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CAMILLA NARJARA SIMÃO OLIVEIRA

O DIMORFISMO SEXUAL E REGULAÇÃO IMUNOENDÓCRINA NA COVID-19

Ribeirão Preto – SP

2022

CAMILLA NARJARA SIMÃO OLIVEIRA

O DIMORFISMO SEXUAL E REGULAÇÃO IMUNOENDÓCRINA NA COVID-19

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção de grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

Ribeirão Preto – SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo de publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Oliveira, Camilla Narjara Simão

O dimorfismo sexual e regulação imunoendócrina na COVID-19

Ribeirão Preto, 2022.

82 f.: II.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/FMRP/USP – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

1. COVID-19; 2. Andrógenos; 3. Dimorfismo sexual; 4. Imunoendocrinologia

Dedico este trabalho à todos que lutam por educação neste país, sobretudo educação gratuita e de qualidade. Que este trabalho possa reafirmar a importância da pesquisa, da ciência e da tecnologia.

Agradecimentos

À Deus por ter me permitido chegar até aqui e por nunca ter me deixado faltar força, sabedoria e resiliência para trilhar o meu caminho e superar todos os obstáculos. Ele me mantém de pé.

Minha eterna gratidão à minha família, sobretudo minha mãe Nataliê e minha vó Lourdes, que sempre apoiaram os meus motivos para sair de casa e estudar tão longe, que nunca deixaram de me enviar amor através da distância e que sempre vibraram a cada visita que eu faço à minha cidade. Trabalho todos os dias para orgulhar vocês.

Aos colegas da escola Sueli Terezinha Danhone, que viram minhas dificuldades para conciliar trabalho e estudo e que me incentivaram com palavras e com gestos sutis de carinho e apoio.

Aos meus amigos Djúlio, Firmino, Anaíde, Ranielle, Gilda, Tayná e Laís. A existência de vocês deixa tudo mais leve.

À secretária do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela paciência e por sempre ter me ajudado com tanta boa vontade, fazendo tudo que estava ao seu alcance, e além.

À minha orientadora Cristina, que se mostrou uma pessoa incrivelmente humana, compreensiva, gentil e paciente. Muitas vezes eu pensei em desistir, mas você sempre acreditou no meu potencial, sempre pegou na minha mão, me guiou, me ensinou muito e confiou em mim. Muito obrigada.

Às agências financiadoras CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste e de outros trabalhos de nosso laboratório.

“A persistência é o caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

OLIVEIRA, C.N.S. O dimorfismo sexual e regulação imunoendócrina na COVID-19.

2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A COVID-19 afeta desproporcionalmente os homens, que são mais propensos a desenvolver complicações após a infecção com SARS-CoV-2 e representam a maioria dos casos graves e que culminam em morte. Essa discrepância é atribuída a variações hormonais e diferenças influenciadas pelo sexo biológico nas respostas imunes. Neste estudo foram avaliadas as interações imunoendócrinas que ditam as diferentes apresentações clínicas da COVID-19 e comorbidades relacionadas ao agravamento da doença. A avaliação de uma coorte local de pacientes gerou um grande conjunto de dados analisados a partir de exames clínicos e de sangue, capazes de informar sobre a gravidade da doença. A partir destes dados, foram quantificados mediadores imunológicos e endócrinos, além da investigação de suas correlações em controles e pacientes infectados. Análises estatísticas consideraram fatores confundidores para analisar o papel dos andrógenos na COVID-19. Os resultados mostraram que homens infectados com SARS-CoV-2 apresentaram maior escore clínico da doença e tiveram tempo maior de hospitalização. De forma geral, os pacientes com COVID-19 grave apresentaram neutrofilia e linfopenia, além da redução de monócitos, eosinófilos e basófilos circulantes. Homens infectados com SARS-CoV-2 tiveram seus níveis de mediadores inflamatórios aumentados (IL-6, IL-8, mas também IL-10) e inversamente correlacionados com os níveis de testosterona, que foram reduzidos na doença grave, independentemente da idade, diabetes, hipertensão, tabagismo, obesidade, outras doenças cardiovasculares ou pulmonares. Houve tendência importante ao aumento dos níveis de di-hidrotestosterona (DHT) nos homens com COVID-19, de forma contrária à redução de testosterona. Finalmente, os níveis de testosterona foram inversamente correlacionados aos escores de gravidade da COVID-19 em homens, mas não em mulheres. Em conclusão, os dados apontam para a junção de parâmetros imunoendócrinos que podem levar ao agravamento da COVID-19 no sexo masculino, o que corrobora para o melhor entendimento da doença e manejo diferencial da COVID-19 entre homens e mulheres infectados pelo vírus SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19; Testosterona; Andrógenos; Inflamação; SARS-CoV-2; Dimorfismo sexual.

ABSTRACT

OLIVEIRA, C.N.S. Sexual dimorphism and immunoendocrine regulation in COVID-19. 2022. 82 f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

COVID-19 disproportionately affects men, who are more likely to develop complications after infection with SARS-CoV-2 and account for the majority of severe cases and fatalities. This discrepancy is attributed to hormonal variations and biological sex-influenced differences in immune responses. In this study, the immunoendocrine interactions that dictate the different clinical presentations of COVID-19 and comorbidities related to the worsening of the disease were evaluated. The evaluation of a local cohort of patients generated a large set of data analyzed from clinical and blood tests, capable to inform about the severity of the disease. From these data, immunological and endocrine mediators were quantified, in addition to investigating their correlations in controls and infected patients. Statistical analyzes considered confounding factors to analyze the role of androgens in COVID-19. The results showed that men infected with SARS-CoV-2 had a higher clinical disease score and had more time of hospitalization. Overall, patients with severe COVID-19 had neutrophilia and lymphopenia, in addition to reduced circulating monocytes, eosinophils, and basophils. Men infected with SARS-CoV-2 had their levels of inflammatory mediators increased (IL-6, IL-8, but also IL-10) and inversely correlated with testosterone levels, which were reduced in severe disease, regardless of age, diabetes, hypertension, smoking, obesity, other cardiovascular or lung diseases. There was a significant trend towards an increase in dihydrotestosterone (DHT) levels in men with COVID-19, as opposed to a reduction in testosterone. Finally, testosterone levels were inversely correlated with COVID-19 severity scores in men but not in women. In conclusion, the data point to the combination of immunoendocrine parameters that can lead to the aggravation of COVID-19 in males, which corroborates for a better understanding of the disease and differential management of COVID-19 between men and women infected with the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: COVID-19; Testosterone; Androgens; Inflammation; SARS-CoV-2; Sexual dimorphism.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Esquema de coleta de dados e amostras de sangue, classificação dos indivíduos em grupos de acordo com a gravidade da doença com base em escore clínico e delineamento experimental para obtenção dos resultados.

Figura 2: Comparação do escore clínico e tempo de hospitalização entre homens e mulheres.

Figura 3: Quantificação e comparação de leucócitos totais do sangue, plaquetas e frequência de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados, divididos por sexo.

Figura 4: Quantificação e comparação de leucócitos totais do sangue, plaquetas e frequência de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos entre indivíduos saudáveis, pacientes não graves e pacientes graves, divididos por sexo.

Figura 5: Quantificação e comparação de citocinas entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados, divididos por sexo.

Figura 6: Quantificação e comparação de citocinas entre indivíduos saudáveis, pacientes não graves e pacientes graves, divididos por sexo.

Figura 7: Quantificação e comparação de hormônios adrenais não sexuais entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados, divididos por sexo.

Figura 8: Quantificação e comparação de hormônios adrenais não sexuais entre indivíduos saudáveis, pacientes não graves e pacientes graves, divididos por sexo.

Figura 9: Quantificação e comparação de hormônios sexuais entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados, divididos por sexo.

Figura 10: Quantificação e comparação de hormônios sexuais entre indivíduos saudáveis, pacientes não graves e pacientes graves, divididos por sexo, com evidência para as comparações entre os hormônios testosterona e DHT, comparados concomitantemente.

Figura 11: Correlogramas para comparação entre os parâmetros imunológicos e endócrinos associados aos resultados do COVID-19 em indivíduos do sexo feminino e masculino.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos indivíduos admitidos no estudo.

Tabela 2: Dados clínicos e demográficos dos controles saudáveis e pacientes com COVID-19.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius.

µg – Micrograma.

µL – Microlitro.

µm – Micrometro.

11_DHC – 11_dehidrocorticosterona.

ACE2 – Enzima conversora de angiotensina 2, do inglês “*angiotensin-converting enzyme 2*”.

ANCOVA – Análise de covariância.

AP-1 – Proteína de ativação 1, do inglês “*activation protein 1*”.

APC – Célula apresentadora de antígeno, do inglês “*antigen-presenting cell*”.

APCI – Ionização química por pressão atmosférica, do inglês “*atmospheric pressure chemical ionization*”.

AR – Receptor de antígeno, do inglês “*antigen receptor*”.

ARDS – Síndrome do desconforto respiratório agudo, do inglês “*acute respiratory distress syndrome*”.

AUC – Área sob a curva, do inglês “*area under the curve*”.

BAFF – Fator ativador de células B, do inglês “*B cell-activating factor*”.

CAAE – Certificado de apresentação de apreciação ética.

CBA – *Cytokine bead array*.

CD – Grupamento de diferenciação, do inglês “*cluster of differentiation*”.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

COVID-19 – Doença do coronavírus-19, do inglês “*coronavirus disease-19*”.

CS – Controle saudável

DCV – Doenças cardiovasculares.

DHEA – Dehidroepiandrosterone, do inglês “*dehydroepiandrosterone*”.

DHT – Di-hidrotosterona, do inglês “*dihydrotestosterone*”.

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “*ethylenediaminetetraacetic acid*”.

FACS – Separador celular ativado por fluorescência, do inglês “*fluorescence activated cell sorter*”.

Fc – Fragmento cristalizável.

FCFRP – Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

FiO₂ – Fração inspirada de oxigênio.

g – Grama.

G – Grave.

GC – Glicocorticoide.

G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos, do inglês “*granulocyte colony-stimulating factor*”.

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos, do inglês “*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*”.

HAS – Hipertensão arterial sistêmica.

HIV – Vírus da imunodeficiência humana, do inglês “*human immunodeficiency virus*”.

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “*high performance liquid chromatography*”.

Hz – Hertz.

IFN – Interferon.

Ig – Imunoglobulina.

IL – Interleucina.

IOT – Intubação orotraqueal.

IP10 – Proteína indutora de interferon gama, do inglês “*interferon γ -inducible protein*”.

IRF – Fator regulador de interferon, do inglês “*interferon regulatory factor*”

IS – Padrão interno, do inglês “*internal standard*”.

JAK – Janus quinase, do inglês “*Janus kinase*”.

kV – Quilovolt.

L – Litro.

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

LHH - Linfocitose hemofagocítica.

MC – Mineralocorticoide.

MCP-1 – Proteína cofator de membrana-1, do inglês “*membrane cofactor protein-1*”.

MERS – Síndrome respiratória do Oriente Médio, do inglês “*Middle East respiratory syndrome*”.

MERS-CoV – Síndrome respiratória do Oriente Médio coronavírus, do inglês “*Middle East respiratory syndrome coronavirus*”.

MIP-1 α – Proteína inflamatória de macrófagos-1 α , do inglês “*macrophage inflammatory protein-1 α* ”.

mL – Mililitro.

mm – Milímetro.

mmHg – Milímetro de mercúrio.

ms – Milissegundo.

m/z – massa/carga.

MRM – Monitoramento de reações múltiplas.

NB2 – Nível de biossegurança 2.

NET - Armadilhas extracelulares do neutrófilo, do inglês “*neutrophil extracellular traps*”.

NF- κ B – Fator nuclear κ B, do inglês “*nuclear factor κ B*”.

Ng – Nanograma.

NG – Não-grave.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês “*pathogen-associated molecular patterns*”.

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio.

PGE₂ – Prostaglandina E₂.

pH – Potencial hidrogeniônico.

ppm – Partes por milhão.

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões, do inglês “*pattern recognition receptors*”.

Psi – Libras por polegada quadrada, do inglês “*pound force per square inch*”.

R – Coeficiente de correlação.

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês “*ribonucleic acid*”.

ROC – Característica de operação do receptor, do inglês “*receiver operating characteristic*”.

RR – Risco relativo.

RT-PCR – Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase, do inglês “*reverse transcription – polymerase chain reaction*”.

SAC – Serviço de análises clínicas.

SARS – Síndrome respiratória aguda grave, do inglês “*severe acute respiratory syndrome*”.

SARS-CoV - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave, do inglês “*severe acute respiratory syndrome coronavirus*”.

SARS-CoV-2 – Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave, do inglês “*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*”.

SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo.

ssRNA – RNA de fita simples, do inglês “*single-stranded RNA vírus*”.

STAT – Transdutor de sinal e ativador de transcrição, do inglês “*signal transducers and activators of transcription*”.

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido.

Th – Células T auxiliares, do inglês “*T helper*”.

TLR – Receptor do tipo toll, do inglês “*toll-like receptor*”.

TMPRSS2 – Serino-protease transmembrana 2, do inglês “*transmembrane serine protease 2*”.

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês “*tumoral necrosis factor- α* ”.

USP – Universidade de São Paulo.

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo.

ZF – Zona fasciculada.

ZG – Zona glomerulosa.

ZR – Zona reticular.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 SARS-CoV-2 e pandemia da COVID-19.....	2
1.2 Resposta imunológica na COVID-19.....	3
1.3 Hormônios esteroides e seus efeitos imunomoduladores.....	5
1.4 Dimorfismo sexual na COVID-19.....	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivo específico.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Caracterização dos participantes do estudo.....	;13
3.2 Coleta e processamento de amostras sanguíneas.....	15
3.3 Quantificação de citocinas plasmáticas por <i>cytometric bead array</i> (CBA).....	16
3.4 Quantificação de hormônios.....	16
3.4.1 Extração de hormônios esteroides.....	16
3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).....	17
3.4.3 Análises estatísticas.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1 Caracterização clínica.....	20
4.2 Caracterização do perfil de células do sistema imune.....	22
4.3 Caracterização do perfil de citocinas.....	25
4.4 Caracterização do perfil hormonal.....	28
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2 e a pandemia da COVID-19

No início de dezembro de 2019, os primeiros casos de pneumonia de origem desconhecida foram identificados na cidade de Wuhan, na China.¹ A doença rapidamente se espalhou, indo além dos limites de sua cidade de origem, sendo identificada em outros países e continentes.² Em janeiro de 2020, um novo coronavírus foi identificado em amostras de lavagem broncoalveolar de um paciente em Wuhan, e foi então confirmado como o causador da doença que, até então, não tinha um agente etiológico definido.

O sequenciamento completo do genoma e análises filogenéticas indicaram que o novo coronavírus é diferente dos betacoronavírus já conhecidos anteriormente³ e associados a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, da sigla em inglês “severe acute respiratory syndrome”), causada pelo vírus SARS-CoV e que atingiu a província de Guangdong em 2002 e 2003⁴, e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS, da sigla em inglês “Medium East respiratory syndrome”), causada pelo vírus MERS-CoV, responsável por surtos de doenças respiratórias graves que atingiram o Oriente Médio em 2012.⁵ Após estudos, este novo coronavírus recebeu o nome de SARS-CoV-2, pois apesar de ser diferente, apresentava similaridades filogenéticas com o já citado vírus SARS-CoV.³

Evidências apontaram que a disseminação do SARS-CoV-2 para humanos ocorreu através do contato com animais selvagens que eram vendidos ilegalmente em um mercado de frutos do mar de Wuhan.⁶ De fato, em dezembro de 2019, os primeiros 4 casos do novo coronavírus foram relatados em pessoas ligadas a este mercado.⁷ As primeiras manifestações clínicas dos pacientes incluíram febre, tosse, dispneia, mialgia, fadiga e evidência radiográfica de pneumonia.¹ Nos estágios iniciais desta pneumonia, sintomas de infecção respiratória aguda grave também ocorreram, com alguns pacientes desenvolvendo rapidamente a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS, da sigla em inglês “acute respiratory distress syndrome”) e outras complicações graves⁶, como choque, lesão cardíaca aguda e insuficiência renal aguda, além do risco de morte.¹

O SARS-CoV-2 possui uma proteína spike (S) extensivamente glicosilada que se projeta da superfície viral para se ligar à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, da sigla em inglês “angiotensin-converting enzyme 2”) e finalmente invadir a célula hospedeira.⁸ A proteína S é composta de duas subunidades funcionais, sendo a subunidade S1 responsável pela

ligação ao receptor ACE2 e a subunidade S2 responsável pela fusão com a membrana da célula hospedeira.⁹ No entanto, para que a proteína S seja capaz de se fundir com a membrana da célula hospedeira e iniciar a invasão celular do SARS-CoV-2, ela precisa ser ativada pela enzima serinoprotease transmembrana 2 (TMPRSS2),¹⁰ utilizada como ferramenta por uma ampla gama de vírus para entrar nas células.¹¹ O gene TMPRSS2 tem altos níveis de expressão na região da próstata e dos pulmões,¹² mas também pode ser expresso em diversos outros órgãos como coração, rim e trato gastrointestinal, sugerindo que esses órgãos são importantes alvos para o SARS-CoV-2.¹³

Relatos de casos finalmente confirmaram a transmissão do SARS-CoV-2 de humano para humano¹⁴, e em Março de 2020 a Organização Mundial da Saúde declarou a COVID-19, denominação da doença causada pelo vírus em questão, uma emergência de saúde pública de interesse internacional.¹⁵ Em 14 de Julho de 2022, foram 560.080.378 casos confirmados de COVID-19 em todo o mundo, totalizando 6.365.952 óbitos em decorrência desta doença.¹⁶

A vacinação, em combinação com hábitos de higienização, distanciamento social e uso de máscaras, são as melhores formas para controlar a pandemia da COVID-19.¹⁷ Até o dia 13 de Julho de 2022, 66,7% da população mundial havia recebido pelo menos uma dose de uma vacina COVID-19, sendo cerca de 12 bilhões de doses foram administradas globalmente.¹⁸

1.2 Resposta imunológica na COVID-19

O sistema imune inato, primeira linha de defesa do organismo e que age rapidamente frente à ameaça de invasão, detecta infecções virais através dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), que reconhecem Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs).¹⁹ A infecção das células do hospedeiro pelo SARS-CoV-2 pode ser reconhecida por receptores TLR, essencialmente TLR7, presente nos endossomos, e esse reconhecimento leva a secreção de proteínas pró-inflamatórias.^{20,21}

Após a entrada do vírus, seu genoma é depositado no citoplasma celular e os processos de tradução e replicação são iniciados, dando origem a novas partículas virais.²² As células infectadas produzem IL-8, que atua como um quimioatraente, especialmente para neutrófilos,²³ que podem atuar por meio de *burst* oxidativo, secreção de defensinas e NETs.²⁴ A resposta imune inata é inicialmente desencadeada por células epiteliais pulmonares, macrófagos alveolares e neutrófilos.²⁵ Neste contexto, partículas virais contendo RNA de cadeia simples (ssRNA) agem como PAMPs e provocam uma forte resposta imunológica inata após serem

reconhecidas por receptores TLR7, que por sua vez podem ativar várias vias de sinalização e fatores de transcrição, como JAK/STAT, NF- κ B, AP-1, IRF3 e IRF7. Esta cascata de sinalização leva ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , e, finalmente, IFN do tipo 1.²⁶

Juntamente com esses eventos, a subsequente apresentação de antígenos por APCs para as células T CD4+ e CD8+ estimula a imunidade adaptativa, tanto humoral quanto celular, que resulta em amplificação da resposta anti-viral. Células B ativadas secretam anticorpos específicos para o vírus, enquanto as células T citotóxicas antígeno-específicas destroem as células infectadas.^{19,22} Além disso, células Th17, neutrófilos e granulócitos secretam IL-17, que por sua vez estimula a produção de IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, TNF, e PGE2, mediadores capazes de aumentar o recrutamento de neutrófilos, monócitos e outras células do sistema imunológico.²⁷ Todas essas vias de sinalização criam um ambiente inflamatório com o objetivo de erradicar o SARS-CoV-2.²⁸

Aparentemente, o aumento dos níveis de citocinas, especialmente IL-6, tem uma associação direta com a pior evolução do paciente.²⁹ Além disso, como níveis mais altos de citocinas levam rapidamente à deterioração da condição dos indivíduos infectados e óbito, podem ser considerados marcadores prognósticos.³⁰

De fato, na COVID-19 pode haver uma situação inflamatória letal denominada síndrome de liberação de citocinas, também conhecida como tempestade de citocinas.³¹ Trata-se de um fenômeno de resposta inflamatória extrema, na qual citocinas são rapidamente secretadas em grandes quantidades em resposta a estímulos infecciosos.³² De fato, esta condição é relacionada ao estado grave observado em pacientes com COVID-19 que necessitam de internação em UTI³³, ocorrendo também em outras doenças como neoplasias, doenças reumatológicas e sepse.³⁴

Dentre vários mediadores produzidos, a tempestade de citocinas na COVID-19 é caracterizada por alta expressão de IL-6 e TNF³⁷, além de IL-1 β , IFN- γ , IP10 e MCP1. Além disso, pacientes internados em UTI apresentam também mais níveis elevados de citocinas como IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF e MIP-1 α do que aqueles que não necessitam de tratamento na UTI.¹ Outro estudo mostrou que a IL-6 foi mais elevada em não sobreviventes do que sobreviventes de COVID-19, sugerindo que a mortalidade por COVID-19 pode ser devido à tempestade de citocinas ativada pelo vírus e a resposta imune decorrente da infecção.³⁸ A resposta inflamatória excessiva causa lesão pulmonar com dano tecidual e edema, além de aumentar a secreção de

mucinas e fibrina, que levam à insuficiência respiratória e morte em pacientes gravemente afetados.²⁸ Além disso, este estado inflamatório está relacionado à linfopenia grave, trombose e infiltração maciça de células mononucleares em outros órgãos,³⁹ além de coagulação intravascular disseminada, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), linfohistiocitose hemafagocítica (LHH) e falência múltipla de órgãos, também relacionada ao estado crítico dos pacientes e subsequente óbito⁴⁰. Por outro lado, os efeitos citopáticos induzidos pelo SARS-CoV-2 e seu escape do sistema imunológico do hospedeiro podem também estar relacionados ao aumento da gravidade da COVID-19.²⁶

1.3 Hormônios esteroides e seus efeitos imunomoduladores

Hormônios esteroides regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e de desenvolvimento, desde a vida fetal até a fase adulta, e são sintetizados a partir do colesterol através de um processo denominado esteroidogênese.⁴¹ Estes mediadores constituem uma grande família de produtos hormonais que são sintetizados principalmente pelo córtex adrenal e pelas gônadas, mas também são produzidos na placenta e no cérebro. Alguns também são metabolizados ou ativados periféricamente, principalmente pelo tecido adiposo, rins, fígado e pele.^{42,43,44} Os hormônios esteroides são substâncias lipossolúveis^{42,43} que podem agir ligando-se preferencialmente a receptores intracelulares e, finalmente, ativando a transcrição gênica.⁴⁵

Os hormônios esteroides são classificados de acordo com suas características bioquímicas e ações específicas com nomes que fazem referência a sua principal ação fisiológica: glicocorticoides (GC), mineralocorticoides (MC) e esteroides sexuais, este último com efeitos androgênicos, estrogênicos e propriedades progestogênicas.⁴⁶ O termo pregnano é atribuído aos derivados do colesterol cujas moléculas contêm 21 átomos de carbono (C21); e androstano (C19) e estrano (C18) para aqueles com 19 e 18 átomos de carbono, respectivamente. Pregnanos dão origem aos glicocorticoides e mineralocorticoides, enquanto andrógenos e os estrógenos derivam dos outros dois.^{47,48}

A glândula adrenal é composta de duas partes, a medula e o córtex.⁴⁵ Diferentes hormônios esteroides são produzidos em diferentes partes do córtex adrenal. Na zona glomerulosa (ZG), a camada mais externa do córtex adrenal, são produzidos os mineralocorticoides, cujo principal produto é a aldosterona, responsável pela retenção de sódio e líquidos, controle da pressão sanguínea e equilíbrio eletrolítico.⁴⁶ A aldosterona é o mineralocorticoide mais potente e responde por cerca de 90% da atividade desta classe de

hormônios.⁴⁹ Embora o cortisol e a corticosterona tenham principalmente atividades glicocorticoides, também possuem alguma atividade mineralocorticoide. O cortisol tem 1/400 da potência da aldosterona, mas sua concentração é cerca de 80 vezes maior do que a aldosterona.^{45,50}

Na zona fasciculada (ZF), intermediária e mais espessa do que as demais camadas, são produzidos os glicocorticoides, cujo produto final é o cortisol, que atua em inúmeros processos metabólicos, hemodinâmicos e inflamatórios,⁴⁶ e que é responsável por cerca de 95% de toda a atividade glicocorticoide.⁵¹ A corticosterona é responsável por uma pequena, mas significativa quantidade da atividade glicocorticoide total. Estresse, dor e inflamação causam aumento da produção de cortisol.⁴⁵

Na zona reticular (ZR), a camada mais interna e que está em contato com a medula adrenal, são produzidos os andrógenos adrenais (por exemplo, dehidroepiandrosterona [DHEA], Sulfato de DHEA e androstenediona), que estimulam o desenvolvimento puberal, crescimento de pelos e libido.⁴⁶ Os andrógenos também são produzidos nas gônadas, que é o principal local de produção da testosterona, e que também secretam di-hidrotestosterona (DHT) e androstenediona.⁴⁵

Nas mulheres, estrógenos e progestágenos podem ser produzidos nas glândulas adrenais ou nas gônadas. A principal função dos estrógenos é promover a proliferação e crescimento de células específicas no corpo que são responsáveis pelo desenvolvimento da maioria das características sexuais secundárias. Os progestágenos, cujo principal representante é a progesterona, são responsáveis pela preparação do útero para a gravidez e das mamas para lactação. Em mulheres que têm os ovários intactos, a contribuição adrenal para a produção de estrógenos circulantes é insignificante. Os homens produzem uma pequena quantidade de estrógenos, as células de Sertoli convertem uma pequena quantidade de testosterona em estrógeno e, além disso, os estrógenos são formados a partir de testosterona e androstenediol periféricamente no fígado.⁴⁵

Hormônios esteroides sexuais têm efeitos profundos sobre o sistema imunológico, e a compreensão desses efeitos pode fornecer pistas importantes para o dimorfismo sexual em várias doenças.⁵² A regulação hormonal das respostas imunológicas é possível devido à presença de receptores para citocinas, neurotransmissores e neuropeptídeos em ambos os sistemas, além da produção de mediadores e produtos neuroendócrinos que modulam a resposta imune e a produção de hormônios.^{53,54} Esta comunicação tem caráter bidirecional;⁵⁵ pois

enquanto o sistema imune é capaz de regular a síntese hormonal,⁵⁶ tais hormônios são capazes de modular a resposta imunológica tanto inata quanto adaptativa.⁵⁷

Dentre os hormônios sexuais, os androgênios são principalmente supressores das imunidades celular e humoral, tendo a capacidade de regular tanto as ações dos linfócitos T como dos linfócitos B.⁵⁸ De fato, a testosterona regula a produção de BAFF,⁵² citocina envolvida na produção de anticorpos por células B, explicando parcialmente o aumento do risco de doenças autoimunes nas mulheres. Estes achados corroboram estudos de décadas atrás, que já apontavam para a maior capacidade de mulheres em produzir imunoglobulinas^{59,60}, o que supostamente está relacionado com a sua aumentada reatividade imunológica e resistência a doenças infecciosas, como as virais^{61,62}. Por exemplo, na infecção por HIV, a carga viral em mulheres é mais baixa que em homens na infecção aguda⁶³. A prevalência e suscetibilidade a outras infecções causadas por vírus são também mais altas nos homens que nas mulheres. Por exemplo, em humanos, a influenza provoca reações mais graves e hospitalização em pacientes do sexo masculino,^{64,65} assim como na gripe aviária (H7N9),^{58,66} gripe suína (H1N1)⁶⁷, síndrome respiratória aguda grave (SARS)^{68,69} e síndrome respiratória do oriente médio (MERS)⁷⁰. Mulheres também apresentam níveis mais altos de anticorpos à vacinação para influenza e maior produção de citocinas inflamatórias em comparação aos homens, que por sua vez têm regulação positiva da expressão de um cluster de genes relacionados com a biossíntese de lipídios, induzido por testosterona e relacionado à baixa atividade de anticorpos neutralizantes contra o vírus⁷¹. Ainda, as respostas imunes mais robustas das mulheres podem levar à redução da carga de patógenos e acelerar a eliminação dos mesmos, por mecanismos dependentes da maior expressão de genes associados às vias de Toll-like receptors (TLR) e respostas antivirais do interferon tipo I (IFN).^{72,73} Além de regular a produção de anticorpos, foi comprovado em casos de orquite autoimune que a testosterona inibe efetivamente o acúmulo de macrófagos e células T CD4+, ao mesmo tempo que aumenta o número de células T reguladoras imunossupressoras no espaço intersticial testicular.⁷⁴ Em modelos experimentais de lúpus, observa-se melhora da doença na ausência de estrogênio e com suplementação de testosterona.⁷⁵ Além disso, homens com hipogonadismo desenvolvem doenças reumáticas/autoimunes mais frequentemente que a população em geral, visto que eles têm baixos níveis séricos de testosterona.⁷⁶

Considerando as diferenças entre os gêneros, o risco maior de mulheres desenvolverem autoimunidade e patologias inflamatórias crônicas sugere que estas doenças são, de algum modo, influenciadas pelos hormônios esteroides sexuais.⁶²

1.4 Dimorfismo sexual na COVID-19

O dimorfismo sexual, ou diferenças biológicas entre macho e fêmea, pode ser notado através de inúmeros processos de desenvolvimento, patológicos e fisiológicos pelos quais os humanos passam.⁷⁷ A observação clínica de que o dimorfismo sexual desempenha um papel na resposta imune sustenta a ideia de que o sistema endócrino é um fator importante para o desenvolvimento e manutenção desta resposta.⁷⁸

A COVID-19 afeta desproporcionalmente os homens, que são mais suscetíveis a ao desenvolvimento de complicações após a infecção com SARS-CoV-2, e que também representam a maioria dos casos graves e desfechos fatais.⁷⁹ Indivíduos do sexo masculino representam aproximadamente 55% das internações, 63% das admissões nas UTIs e 57% dos óbitos, de acordo com dados divulgados pelo projeto Global Health 50/50.⁸⁰ A maior taxa de mortalidade entre os homens por COVID-19 é consistente com surtos anteriores, como SARS, MERS e a pandemia de gripe de 1918.⁸¹ Essa discrepância é atribuída a variações hormonais e diferenças dependentes do sexo nas respostas imunológicas, juntamente com a prevalência de certas comorbidades e fatores ambientais ou de estilo de vida mais frequentes em homens.^{82,83} As diferenças nas respostas biológicas de homens e mulheres podem ser importantes para determinar os resultados clínicos na COVID-19.⁸⁴

Acredita-se que a enzima ACE2 seja importante no risco de desenvolver a doença grave, já que seus níveis de expressão são geralmente mais altos em homens, o que significa que mais células podem ser vulneráveis ao vírus e isso, por sua vez, pode levar a um maior risco de desfechos graves de COVID-19 e morte.⁸⁴ Outro fator importante e que reflete no dimorfismo sexual é que, como os hormônios esteroides (como a testosterona) são produzidos em níveis mais elevados em homens, este fato está associado a diferentes desfechos de doenças infecciosas e autoimunes, devido ao seu papel regulador nestes cenários.^{52,85} A testosterona sinaliza células imunológicas por meio do desencadeamento de seus receptores androgênicos (AR) e pode regular a inflamação,⁵² que, por sua vez, é uma das características das complicações do COVID-19.⁸⁶ Concomitantemente, a proteína spike do SARS-CoV-2, que medeia a entrada deste vírus no organismo do hospedeiro, é dependente de proteases,⁸⁷ como

TMPRSS2, que é um gene regulado por andrógenos.⁸⁸ Os níveis de testosterona diminuem progressivamente durante a senescência em homens e, de fato, os dados epidemiológicos da COVID-19 também apontam para um papel da idade mais avançada e algumas comorbidades concomitantes nos desfechos dessa doença, como obesidade, diabetes e hipertensão, dentre outras.^{89,90}

Sabendo da interação imunoendócrina e da influência dos hormônios esteroides, principalmente os sexuais, no desenvolvimento e no desfecho da infecção causada pelo SARS-CoV-2, torna-se importante a investigação dessas interações, visando utilizá-las como ferramentas para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para a COVID-19. Desta forma, este trabalho busca entender a evolução clínica de homens e mulheres com COVID-19 e, através de combinações específicas de marcadores clínicos e imunoendócrinos, prever seus resultados finais, progressão para COVID-19 grave e morte. Esses dados podem orientar futuros estudos para elucidar os mecanismos exatos responsáveis pela disparidade entre os sexos na infecção por SARS-CoV-2, e a elucidação desses mecanismos é fundamental para gerenciar a pandemia no que diz respeito ao tratamento, vacinação e medidas de saúde pública.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar as principais interações imunoendócrinas relacionadas às diferentes apresentações clínicas da COVID-19.

Objetivos específicos

2.2.1 Determinar potenciais biomarcadores para a evolução grave da COVID-19.

2.2.2 Buscar fatores de suscetibilidade e resistência.

2.2.3 Analisar o perfil de citocinas e de produção de hormônios esteroidais e seus metabólitos ativos nos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.

3. Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos participantes do estudo

Os participantes do estudo foram admitidos antes da vacinação contra a COVID-19, de abril de 2020 a janeiro de 2021, após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e eram pacientes que testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2. O diagnóstico foi confirmado através de Real Time PCR (RT-PCR) ou ensaios sorológicos (IgM+), e controles saudáveis, que não apresentaram sintomas de COVID-19 e testaram negativo na amplificação por RT-PCR do RNA viral extraído de swab nasofaríngeo. Os pacientes foram categorizados em grupos, de acordo com as diretrizes da OMS e com base em Lucas *et al*, 2020,⁹¹ com algumas modificações (Tabela 1). Em todos os grupos foram incluídos indivíduos do sexo masculino e feminino.

Os indivíduos saudáveis eram voluntários do Parque Tecnológico SUPERA (cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil), enquanto os indivíduos com COVID-19 participaram do estudo durante quarentena domiciliar ou internação em duas instituições diferentes de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil – Hospital Santa Casa de Misericórdia e Hospital São Paulo. As informações detalhadas dos pacientes foram obtidas de prontuários médicos e através de comunicação pessoal com os próprios indivíduos controles saudáveis e pacientes ambulatoriais infectados com SARS-CoV-2. O trabalho contou com a colaboração dos médicos do Hospital São Paulo, Dr. José Joaquim Ribeiro da Rocha, Dr. Omar Feres, Dr. Marley Ribeiro Feitosa, Dr. Rogério Serafim Parra, Dr. Fernando Crivelenti Vilar e Dr. Gilberto Gambará Gaspar. Além disso, participaram os médicos do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, Dr. Augusto Marcussi Degiovani; Dra. Leticia de Freitas Constant; e Dra. Fátima Magro. Estes profissionais foram responsáveis pela seleção, avaliação clínica e acompanhamento dos pacientes hospitalizados, envolvendo a caracterização e classificação da gravidade da doença, com base no histórico clínico, exames físicos, de imagens e laboratoriais. Os protocolos do estudo foram de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o código CAAE: 30525920-7-0000-5403. Amostras de sangue venoso foram colhidas para realização dos ensaios descritos nos objetivos desta pesquisa.

Resumidamente, os pacientes foram classificados de acordo com o escore da doença, que resultou de avaliação clínica e exames laboratoriais (Tabela 2). As características avaliadas foram a presença de sintomas relacionados à COVID-19, oximetria de pulso, PaO₂/FiO₂, suporte hospitalar em unidade de terapia intensiva (UTI), suplementação de oxigênio em cateter

de baixo fluxo ou máscaras de ventilação, intubação orotraqueal (IOT) e marcadores de evolução da doença como necessidade de hemodiálise, sepse, coagulação intravascular disseminada ou falência de múltiplos órgãos. Cada um desses parâmetros recebeu uma pontuação específica e a soma desses pontos foi definida como o escore individual da doença do paciente. Assim, os participantes do estudo foram categorizados como não graves (0-4) ou graves, cujo escore variou de 6 a 16 pontos dependendo das variáveis descritas acima. Em seguida, indivíduos do sexo feminino e masculino foram comparados dentro dos grupos controle saudável (CS), não grave (NG) ou grave (G), definidos de acordo com os parâmetros pontuados no dia da coleta de sangue. Para as mulheres, tivemos um total de 56 pacientes CS, 45 NG e 44 G, enquanto os homens foram 36 CS, 47 NG e 62 G. O delineamento experimental deste estudo encontra-se resumido e esquematizado abaixo, na Figura 1.

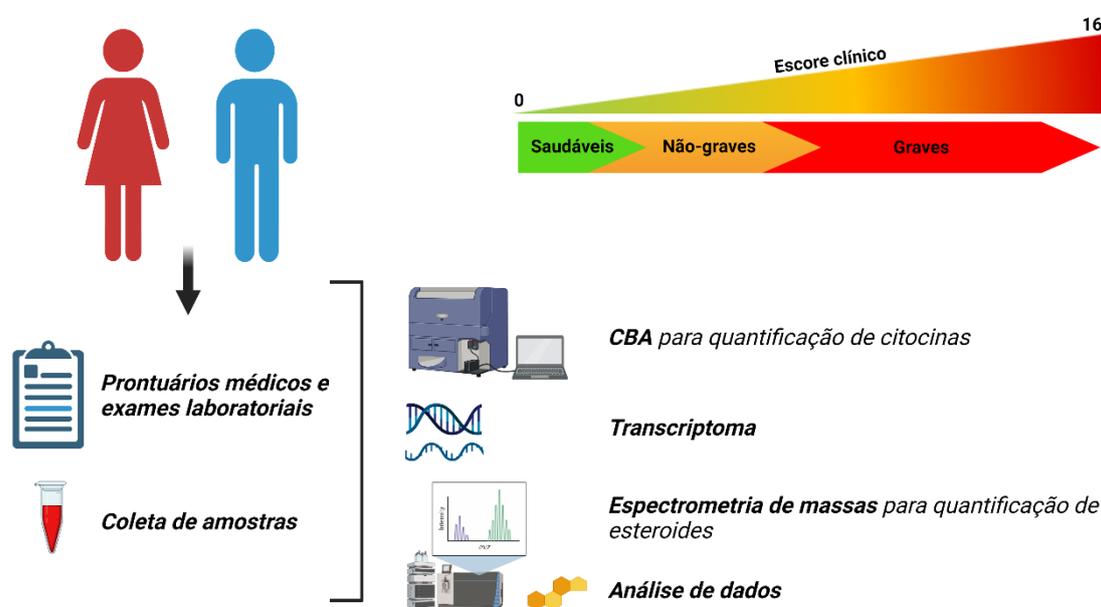


Figura 1. Esquema de coleta de dados clínicos e amostras, classificação dos pacientes e obtenção de dados experimentais. O estudo contou com a participação de indivíduos dos sexos feminino e masculino, que foram categorizados em grupos. Indivíduos que testaram negativo para COVID-19 foram incluídos no grupo controle saudável, enquanto indivíduos que foram detectados como infectados com SARS-CoV-2 foram incluídos nos grupos de pacientes não-graves e graves, de acordo com escore clínico da doença, definido com base na avaliação clínica e exames laboratoriais desses pacientes. As amostras de sangue (plasma) foram utilizadas para a quantificação de citocinas por *cytometric bead array* (CBA) e hormônios por espectrometria de massas. Os leucócitos do sangue periférico foram utilizados para ensaio de transcriptoma, alvo de estudos de outro trabalho do grupo.

Tabela 1. Classificação dos pacientes admitidos no estudo.

Classificação	Sintomas e parâmetros laboratoriais
Controles saudáveis (CS)	<ul style="list-style-type: none">Sem detecção de RNA viral por PCRAusência de sinais clínicos para COVID-19
Doença não grave (NG)	<ul style="list-style-type: none">Detecção do material genético do SARS-CoV-2 por PCR e/ou presença de IgM⁺ após teste sorológicoAusência ou presença de febre, dispneia, tosse, fadiga, diarreia, vômito, dor de cabeça, ageusia, anosmia ou mialgiaSaturação de oxigênio $\geq 93\%$Se necessário, uso de catéter de baixo fluxo ou máscara de ventilaçãoSem necessidade de intubação orotraqueal (IOT)
Doença grave (G)	<ul style="list-style-type: none">Detecção do material genético do SARS-CoV-2 por PCR e/ou presença de IgM⁺ após teste sorológicoHospitalização em unidade de tratamento intensivo (UTI)Saturação de oxigênio $< 93\%$PaO₂/Fio₂ $< 250\text{mmHg}$Manifestação de desconforto respiratório gravePode haver necessidade de IOTPode haver necessidade de hemodiálise e desenvolvimento de sepse, choque séptico ou falência múltipla de órgãos

3.2 Coleta e processamento de amostras sanguíneas

Para todos os participantes deste estudo, profissionais qualificados e que fazem parte do consórcio ImmunoCOVID colheram amostras de sangue venoso. Para os indivíduos infectados com SARS-CoV-2 que não necessitaram de internação hospitalar, os exames de rotina de análises clínicas foram realizados no SAC – Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP. Para aqueles pacientes que necessitaram de hospitalização, os exames de rotina e análises clínicas foram realizados pelos hospitais em que esses indivíduos estavam internados. As amostras foram encaminhadas ao laboratório NB2 da FCFRP/USP para os ensaios propostos sem identificação nominal do paciente, que foi identificado apenas por um código numérico. O sangue foi centrifugado para obtenção de plasma e leucócitos (*buffy coat*) e parte do plasma EDTA foi misturado com metanol (1:1, v/v). As amostras resultantes deste processamento foram encaminhadas para o SAC para análises clínicas ou foram armazenadas em freezer -80°C para posterior quantificação citocinas e extração, aquisição e análise de esteroides por LC-MS/MS.

3.3 Quantificação de citocinas plasmáticas por *cytometric bead array* (CBA)

As citocinas plasmáticas (IL-6, IL-8 e IL-10, IL12p70, IL-1 β e TNF) foram quantificadas por citometria de fluxo, utilizando-se o Human Inflammatory Cytokine CBA (BD Biosciences, San Diego, EUA), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS Canto II e os resultados analisados pelo software FCAP array v3 (BD).

3.4 Quantificação de hormônios

3.4.1 Extração de hormônios esteroides

A extração, aquisição e análise de esteroides por LC-MS/MS foi feita com base em um protocolo adaptado de Wang *et al*, 2014.⁹² Para proceder à extração dos hormônios, o metanol das amostras foi evaporado e o conteúdo restante foi ressuspense em 250 μ L de tampão acetato (0,5 mol/L, pH 5,5), seguido de 2h de agitação em temperatura ambiente. Em seguida, 10 μ L de solução de padrão interno (IS) foram adicionados para a quantificação dos hormônios. Para a extração líquido-líquido, adicionamos 800 μ L de acetato de etila:hexano frio (6:4, v/v) às amostras, que foram homogeneizadas em um Bead-ruptor (Omni) por 3 minutos a 10 Hz. A fase orgânica, que contém os hormônios, foi coletada e transferida para um tubo de 2 mL. A fase aquosa foi submetida a uma segunda extração, com adição de 800 μ L de ácido fórmico a 10% em acetato de etila, seguido de homogeneização em Bead-ruptor por 3 minutos a 10 Hz, seguindo para centrifugação por 10 minutos, 2000 x g e 4°C. A fase orgânica foi recolhida e misturada à primeira fração de extração. Essas camadas orgânicas combinadas foram evaporadas usando um sistema speed vac (Eppendorf) a 30°C. Em seguida, o extrato da amostra foi redissolvido em 300 μ L de tampão carbonato de amônio (0,2 mol/L, pH 9,8). Em seguida, 600 μ L de acetato de etil:hexano (6:4, v/v) foram adicionados para outra rodada de extração. A fase orgânica foi coletada em um tubo de 2 mL e 600 μ L de acetato de etil puro foi adicionado à fase aquosa, homogeneizado novamente no bead-ruptor (3 minutos a 10 Hz), e as camadas orgânicas foram combinadas e evaporadas no sistema speed vac. A amostra final do extrato hormonal esteroide foi reconstituída em 50 μ L de metanol:água (7:3, v/v), homogeneizado em vórtex por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos a 2000 x g e 4°C. O sobrenadante foi transferido para frascos de injeção de HPLC.

3.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)

A separação cromatográfica foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Nexera, da Shimadzu (Kyoto, HO, JP) de acordo com Peti et. al, 2018.⁹³ As fases móveis utilizadas foram (A) ácido fórmico 0,1% em água e (B) ácido fórmico 0,1% em acetonitrila. Foi utilizada a coluna Ascentis Express C18 (100 x 2,1 mm; 2,7 µm) da Supelco (St. Louis, MO, EUA), com volume de injeção de 10µL e vazão de 0,5 mL/min. A condição de gradiente foi de 1 minuto com 30% da fase B, seguido de aumento para 50% até o minuto 2, e depois 60% no intervalo entre os minutos 2-5, que foi mantido até 8 minutos. Em seguida, aumentou-se para 98% da fase B (9 minutos), mantendo-se esta condição até 11 minutos. As configurações de canal MRM, a energia de colisão e o potencial de desagrupamento foram otimizados para os alvos hormonais individuais (11_dehidrocorticosterona (11_DHC), cortisol, aldosterona, cortisona, testosterona, di-hidrotestosterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, androsterona, adrenosterona e estrona). A análise por espectrometria de massas foi realizada utilizando um TripleTOF® 5600+ (Sciex-Foster, CA, EUA), em modo de operação positivo. Os parâmetros estabelecidos foram gás 1: 60 psi; gás 2: 40 psi; gás de cortina: 25 psi; voltagem de pulverização de íons: 5 kV; temperatura turbo: 550°C; faixa de m/z dos íons produto: 50 a 400; e tempo de permanência: 100 ms. A solução de calibração negativa de ionização química à pressão atmosférica (APCI) (Sciex – Foster, CA, EUA) foi usada para calibração de massa (< 2 ppm). Os dados foram adquiridos com o software Analyst™ (SCIEX-Foster, CA, EUA). A identificação dos hormônios foi realizada com o software PeakView™ (SCIEX-Foster, CA, USA) e sua quantificação foi feita pelo software MultiQuant™ (SCIEX-Foster, CA, USA), que normaliza as intensidades de pico de íons moleculares individuais de acordo com um padrão interno para cada hormônio esteroide. A concentração final dos hormônios lipídicos foi normalizada pelo volume inicial de plasma e os resultados foram expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL). A metodologia de espectrometria de massas aqui utilizada quantificou os hormônios plasmáticos totais e compreendeu etapas de dissociação para remoção de proteínas, para aumentar a precisão da quantificação dos mesmos.

3.4.3 Análises estatísticas

Os dados do estudo foram descritos como frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas), bem como média, desvio padrão, valores mínimo, mediano e máximo (variáveis quantitativas). Em relação às comparações entre grupos e sexo para variáveis quantitativas, foi utilizada a análise de covariância (ANCOVA) que permitiu as comparações de grupos, além do ajuste de covariáveis.⁹⁴ Os modelos utilizados para a obtenção dos dados foram ajustados para faixa etária e covariáveis como obesidade, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, outras doenças cardiovasculares (incluindo insuficiência cardíaca, doença de Chagas, cardiomegalia, angina instável, doença ateromatosa difusa, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, varizes, insuficiência venosa crônica, arritmias cardíacas), doenças respiratórias (asma, bronquite, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfisema, lesão pulmonar, tromboembolismo pulmonar e pneumonia) e histórico de tabagismo.

Para os correlogramas, foi utilizada a função `corrplot` do pacote R “`corrplot`” (versão 0.84) para construir os gráficos a partir das matrizes de correlação computadas. Os coeficientes de correlação (r) e os valores de p foram formatados e organizados usando o pacote `Hmisc` em R. Os coeficientes de correlação de Spearman (ρ) foram calculados e os valores de p exatos foram obtidos. Da mesma forma, a análise de correlação entre os e as variáveis contínua e discreta “testosterona” e “dias de internação”, respectivamente, foi realizada pelo teste de Spearman. Por outro lado, a correlação entre testosterona e a variável ordinal “suporte respiratório” (0: sem suporte, 1: cateter nasal de baixo fluxo, 2: máscaras de ventilação, 3: IOT) foi analisada por correlação polisserial.

As análises foram realizadas com o software SAS 9.4 e GraphPad PrismTM (versão 9.0) (San Diego, CA, EUA). Para todas as comparações, adotou-se o nível de significância de 5%. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism e R versão 4.0.4.

4. Resultados

4.1 Caracterização clínica

Foram admitidos no estudo 290 indivíduos, dentre eles 92 pessoas não infectadas com SARS-CoV-2 (56 mulheres e 36 homens) e pacientes com COVID-19, classificados como pacientes não graves (92 indivíduos, sendo 47 mulheres e 45 homens) ou graves (106 indivíduos, sendo 44 mulheres e 62 homens), conforme escore clínico. Desta forma, a maioria dos indivíduos doentes graves eram homens (Tabela 2), corroborando com dados divulgados por outros estudos.²

Como já é sabido, fatores do hospedeiro, incluindo sexo, comorbidades e idade são os importantes determinantes da gravidade e progressão da COVID-19.⁹⁵ Observando os pacientes acometidos com a forma grave da doença, a maioria possui acima de 50 anos (79,55% das mulheres e 79,03% dos homens), confirmando que o envelhecimento em si é um fator de risco proeminente para doença grave e morte por COVID-19.⁹⁵ É possível notar também que a maioria dos pacientes com a forma grave apresentava hipertensão arterial sistêmica (80,49% das mulheres e 60,71% dos homens), enquanto que uma parcela também era diabética e/ou obesa. A maioria dos pacientes graves fez uso de corticoide (81,82% das mulheres e 90,32% dos homens, Tabela 2), embora de forma estatisticamente similar; ou seja, não houve diferenças relevantes do uso deste medicamento entre homens e mulheres. Ademais, 100% das mulheres e 96,77% dos homens em estado grave necessitaram de suporte respiratório, especialmente intubação orotraqueal (Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos controles saudáveis e pacientes com COVID-19.

Variáveis	Controles saudáveis (n, %)		Não grave (n, %)		Grave (n, %)	
	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens
Faixa etária						
Até 50 anos	46 (82.14%)	29 (80.56%)	35 (77.78%)	27 (57.45%)	9 (20.45%)	13 (20.97%)
Acima de 50 anos	10 (17.86%)	7 (19.44%)	10 (22.22%)	20 (42.55%)	35 (79.55%)	49 (79.03%)
Obesidade						
Não	46 (82.14%)	28 (77.78%)	33 (73.33%)	31 (65.96%)	23 (53.49%)	38 (61.29%)
Sim	10 (17.86%)	8 (22.22%)	12 (26.67%)	16 (34.04%)	20 (46.51%)	24 (38.71%)
Diabetes						
Não	54 (96.43%)	32 (88.89%)	39 (88.64%)	33 (75%)	24 (58.54%)	31 (55.36%)
Sim	2 (3.57%)	4 (11.11%)	5 (11.36%)	11 (25%)	17 (41.46%)	25 (44.64%)
HAS*						
Não	50 (89.29%)	29 (80.56%)	39 (88.64%)	33 (75%)	8 (19.51%)	22 (39.29%)
Sim	6 (10.71%)	7 (19.44%)	5 (11.36%)	11 (25%)	33 (80.49%)	34 (60.71%)
Outras DCV**						
Não	52 (92.86%)	32 (88.89%)	36 (81.82%)	36 (81.82%)	34 (82.93%)	46 (82.14%)
Sim	4 (7.14%)	4 (11.11%)	8 (18.18%)	8 (18.18%)	7 (17.07%)	10 (17.86%)
Doenças respiratórias						
Não	53 (94.64%)	29 (80.56%)	32 (72.73%)	37 (84.09%)	39 (95.12%)	50 (89.29%)
Sim	3 (5.36%)	7 (19.44%)	12 (27.27%)	7 (15.91%)	2 (4.88%)	6 (10.71%)
Histórico de tabagismo						
Não	41 (73.21%)	27 (75%)	42 (97.67%)	35 (83.33%)	30 (93.75%)	41 (77.36%)
Sim	15 (26.79%)	9 (25%)	1 (2.33%)	7 (16.67%)	2 (6.25%)	12 (22.64%)
Uso de Corticoide						
Não						

Sim	56 (100%) 0 (0%)	36 (100%) 0 (0%)	34 (75.56%) 11 (24.44%)	23 (50%) 23 (50%)	8 (18.18%) 36 (81.82%)	6 (9.68%) 56 (90.32%)
Suporte respiratório						
Não	56 (100%)	36 (100%)	39 (86.67%)	27 (57.45%)	0 (0%)	2 (3.23%)
Sim	0 (0%)	0 (0%)	6 (13.33%)	20 (42.55%)	44 (100%)	60 (96.77%)
Morte						
Não	56 (100%)	36 (100%)	44 (97.78%)	43 (91.49%)	19 (43.18%)	30 (48.39%)
Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (11.36%)	4 (8.51%)	25 (56.82%)	32 (51.61%)

*HAS: hipertensão arterial sistêmica

** DCV: doenças cardiovasculares

Como esperado, as taxas de mortalidade aumentam substancialmente entre os pacientes com COVID-19 grave, sendo este o desfecho de 56,82% das mulheres e 51,62% dos homens deste grupo. A categorização detalhada dos indivíduos de acordo com o sexo e o estado da doença, juntamente com seus dados demográficos, está descrita na tabela acima.

Considerando-se o agravamento da COVID-19 em uma parcela dos pacientes infectados, foram realizadas comparações em relação ao tempo de hospitalização e escore clínico de homens e mulheres (Figura 2). Observou-se que os indivíduos do sexo masculino necessitaram de tempo maior de hospitalização até o desfecho clínico da doença (óbito ou convalescença), que as mulheres. Os homens com COVID-19 também apresentarem escore clínico maior, indicando que, na maioria dos casos, a doença se apresenta de forma mais grave no sexo masculino, como relatado em outros trabalhos.⁹⁶⁻⁹⁸

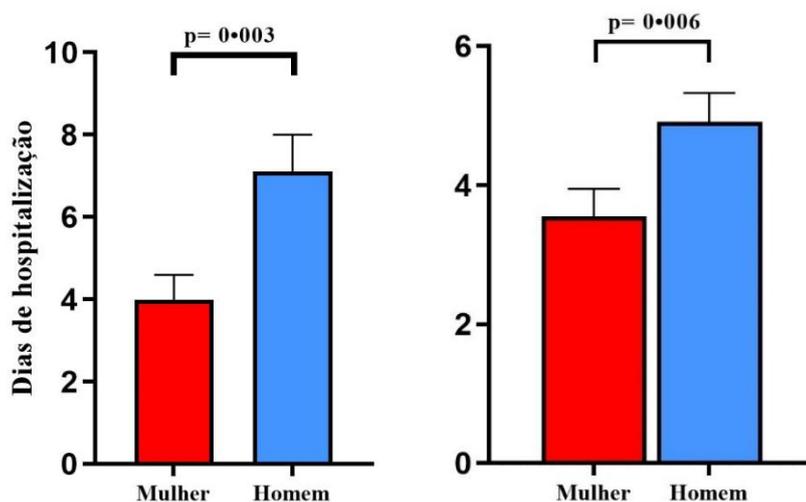


Figura 2. Comparação do tempo de hospitalização e escore clínico da COVID-19 entre homens e mulheres. O período de internação (em dias) e o escore clínico da doença foram retratados na figura. A análise foi feita através da comparação entre os homens e mulheres participantes do estudo, considerando-se um n total de 145 mulheres e 145 homens em cada grupo. Os valores exatos de p estão representados na figura.

Como homens, pacientes idosos ou com comorbidades correm maior risco de desenvolver COVID-19 grave, as avaliações seguintes relacionadas às comparações entre sexos dos grupos graves ou não graves foram ajustadas conforme os fatores confundidores idade,

obesidade, diabetes, hipertensão arterial, outras doenças cardiovasculares, história de tabagismo e doenças pulmonares.

4.2 Caracterização do perfil de células do sistema imune

Durante a infecção por SARS-CoV-2, algumas células do sistema imunológico, como neutrófilos, têm sua população aumentada, enquanto outras, como os linfócitos, tornam-se menos frequentes.³⁷ As análises de sangue dos participantes do nosso estudo mostraram que comparado com os indivíduos controle, os pacientes com COVID-19 apresentaram aumento na quantidade de leucócitos totais circulantes, condição conhecida como leucocitose (Figuras 3A e 4A). Após a análise individual dos leucócitos, foi visto que os neutrófilos tiveram um aumento considerável em seu número, o que chamamos de neutrofilia, e que corrobora com dados já conhecidos da literatura. A neutrofilia pôde ser detectada tanto quando analisamos os indivíduos com COVID-19 de forma geral como separadamente (após ajustes de confundidores), sendo que, dentre os grupos de pacientes, a neutrofilia mais acentuada foi vista no grupo grave, em ambos os sexos (Figuras 3B e 4B). Como esperado, houve redução do número de linfócitos circulantes, condição conhecida como linfopenia, tanto na análise dos indivíduos infectados como um todo quanto separadamente em grupo (Figuras 3C e 4C), e que assim como a neutrofilia, foi mais acentuada na COVID-19 grave, independentemente do sexo dos pacientes (Figura 4C). Da mesma forma, os eosinófilos, basófilos e monócitos circulantes foram reduzidos durante a COVID-19 (Figuras 3D-F), e quando olhamos os grupos separadamente, percebe-se que essas células estão reduzidas em pacientes graves em comparação com indivíduos saudáveis ou com COVID-19 não grave (Figuras 4D-F), embora os homens tenham mantido níveis significativamente mais elevados de monócitos do que as mulheres no pior cenário clínico (Figura 4F). Não houve diferença significativa na quantificação de plaquetas entre os indivíduos saudáveis e pacientes com COVID-19, mesmo quando analisados os grupos categorizados conforme a gravidade da doença. (Figuras 3G e 4G).

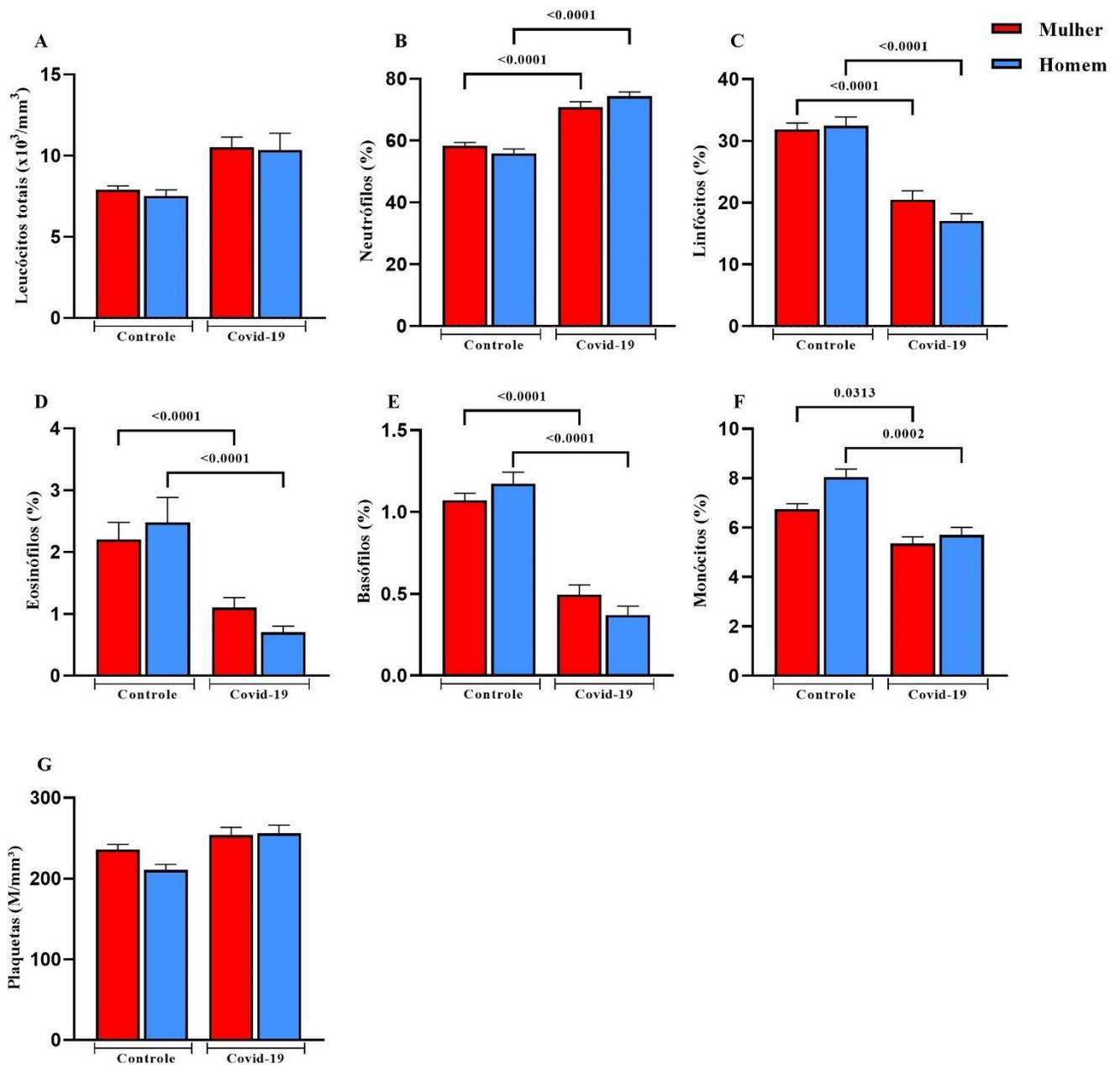


Figura 3. Quantificação de leucócitos do sangue periférico de controles saudáveis e pacientes infectados com SARS-CoV-2. Exames laboratoriais e contagem de leucócitos foram obtidos conforme descrito na Figura 1. Em (A) leucócitos totais do sangue, (B) frequência de neutrófilos (%), (C) linfócitos (%), (D) eosinófilos (%), (E) basófilos (%), (F) monócitos (%) e (G) plaquetas (M/mm^2). As análises foram realizadas entre indivíduos saudáveis e pacientes infectados, divididos por sexo, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle e 89 mulheres e 109 homens no grupo COVID-19. Os valores exatos de p estão representados na figura.

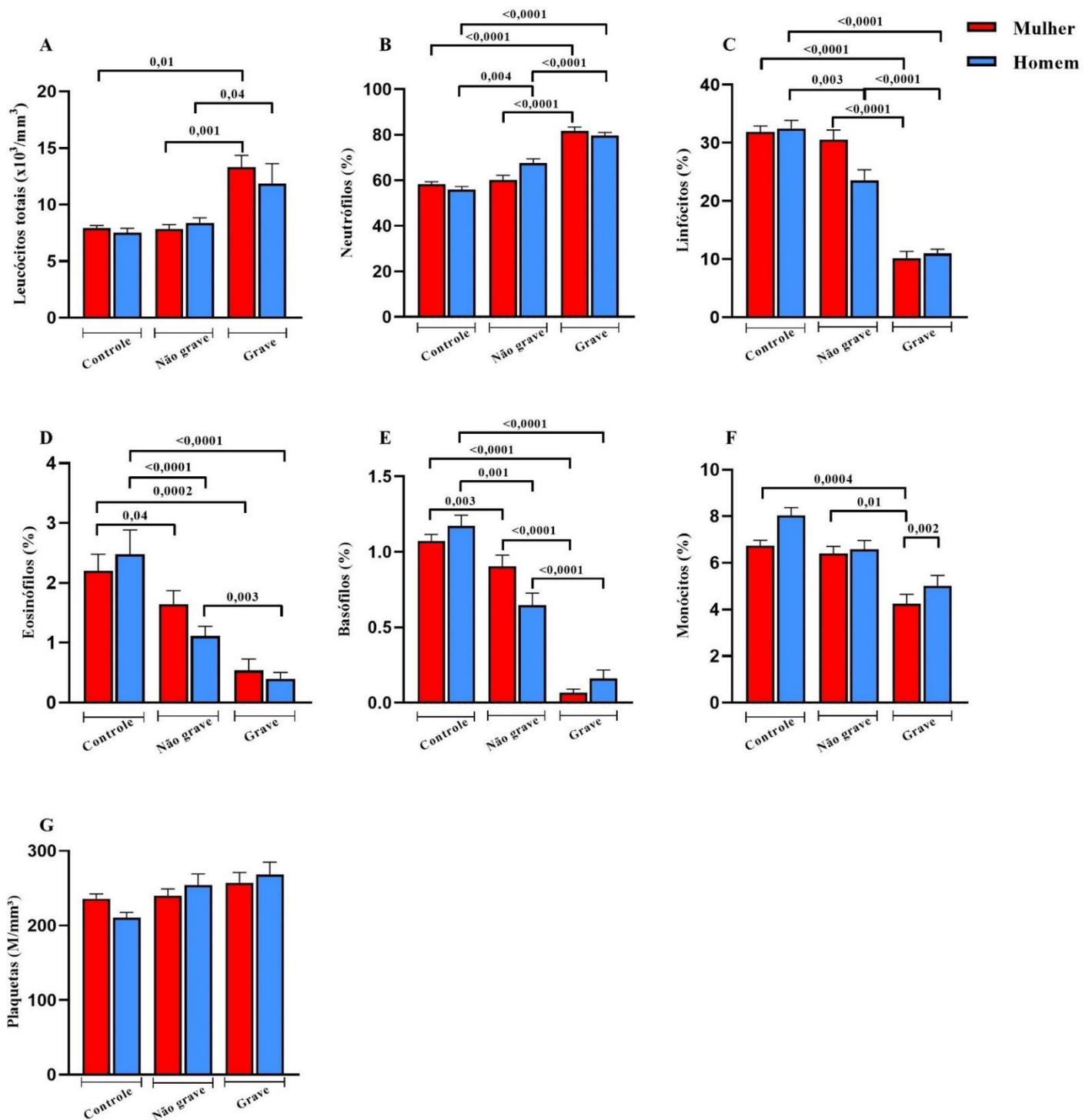


Figura 4. Quantificação de leucócitos do sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com COVID-19, separados em grupos de acordo com a gravidade da doença. Exames laboratoriais e contagem de leucócitos foram obtidos conforme descrito na Figura 1. Em (A) leucócitos totais, (B) frequência de neutrófilos (%), (C) linfócitos (%), (D) eosinófilos (%), (E) basófilos (%), (F) monócitos (%) e (G) plaquetas (M/mm²). As análises foram realizadas entre indivíduos saudáveis e pacientes com a forma não grave e grave da COVID-19, divididos por sexo, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle, 45 mulheres e 47 homens no grupo não grave e 44 mulheres e 62 homens no grupo grave. Os valores exatos de p estão representados na figura.

4.3 Caracterização do perfil de citocinas

A inflamação sistêmica que acomete pacientes com COVID-19 pode ser vista com alterações na produção de citocinas plasmáticas, que refletem a atividade da doença.^{32,37} Sendo assim, utilizando amostras de sangue de indivíduos saudáveis e pacientes com COVID-19, foi realizada a quantificação de citocinas circulantes e comparação do perfil imunológico entre os 3 grupos (controles saudáveis, não graves e graves).

Os resultados mostraram que houve aumento significativo das citocinas IL-6 e IL-8 em pacientes com COVID-19 de forma geral, independentemente do sexo ou gravidade da doença (Figuras 5B e 5C, respectivamente). A produção de IL-10 foi significativamente mais alta nos pacientes com COVID-19 comparando-se aos saudáveis, especialmente nos homens em relação às mulheres doentes (Figura 5D). Pacientes do sexo feminino apresentaram maior produção de TNF durante a COVID-19 em comparação a mulheres não infectadas (Figura 5F), enquanto não foram observadas alterações relevantes em IL-12 e IL-1 β (Figuras 5A e 5E, respectivamente).

Quando analisamos os grupos separadamente e realizamos as análises conforme os fatores confundidores, observamos que o aumento se mantém em IL-6, IL-8 e IL-10, de acordo com a gravidade da doença, independentemente do sexo dos pacientes (Figuras 5B-D). Confirmando os resultados anteriores, não houve alterações significativas na produção de IL-12p70 entre os indivíduos em nenhum dos cenários (Figuras 5A e 6A) e quando analisamos IL-1 β e TNF entre os 3 grupos, o aumento de citocinas na COVID-19 não foi detectado (Figuras 6E-F)

Esse conjunto de dados nos permitiu caracterizar imunologicamente os pacientes homens e mulheres com COVID-19, que apresentam características inflamatórias relevantes para o curso da doença.

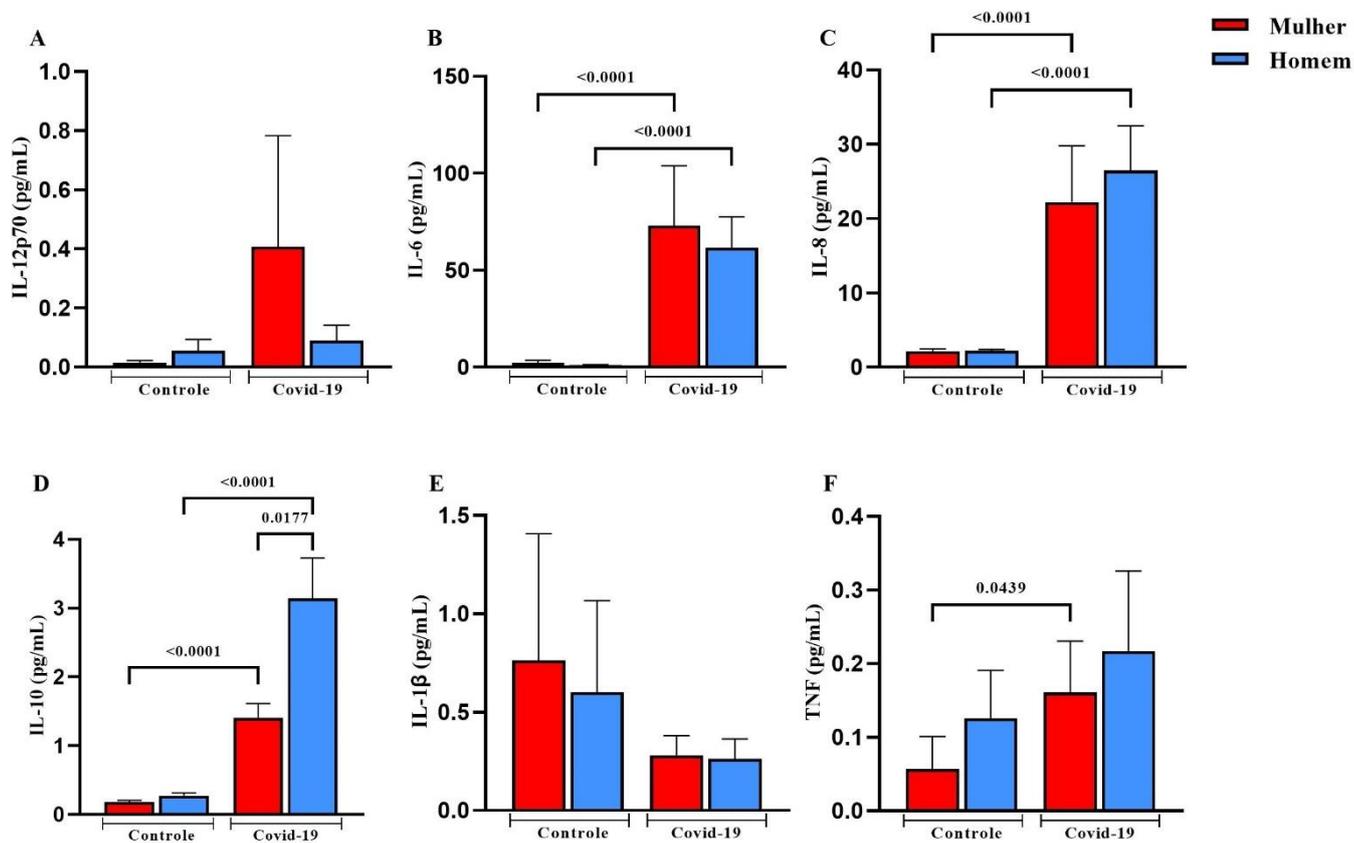


Figura 5. Quantificação de citocinas em controles saudáveis e pacientes com COVID-19. *Cytokine Bead Array* (CBA) foi realizado para análise das citocinas e determinação da concentração destes mediadores no sangue periférico de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle e 89 mulheres e 109 homens no grupo COVID-19. Os valores exatos de p estão representados na figura.

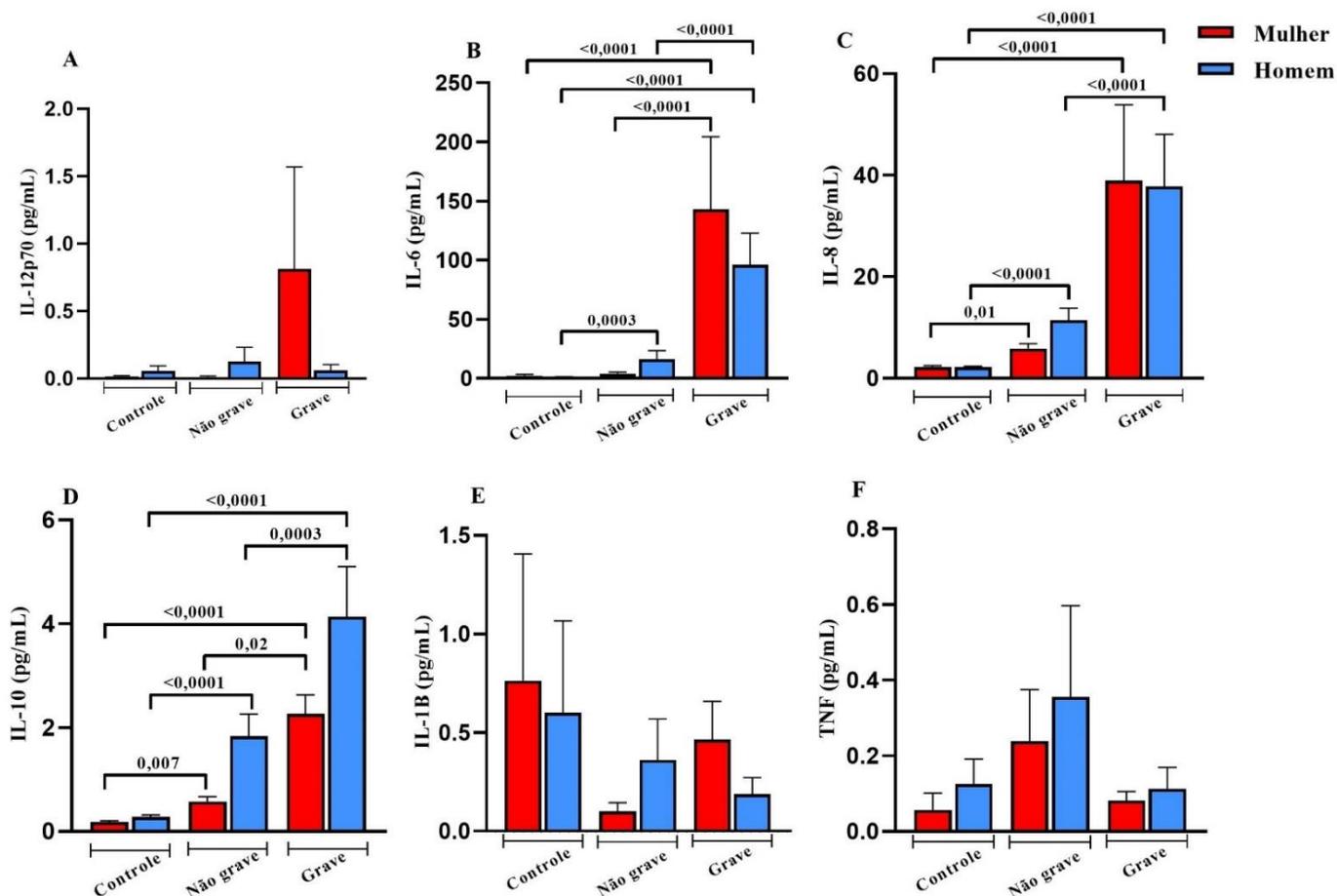


Figura 6. Quantificação de citocinas em controles saudáveis e pacientes com COVID-19, separados em grupos de acordo com o sexo e a gravidade da doença. *Cytokine Bead Array* (CBA) foi realizado para análise das citocinas para determinação da concentração destes mediadores no sangue periférico de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle, 45 mulheres e 47 homens no grupo não grave e 44 mulheres e 62 homens no grupo grave. Os valores exatos de p estão representados na figura.

4.4 Caracterização do perfil hormonal

Em sequência, sabendo da existência da interação imunoendócrina e do importante papel dos hormônios esteroides na regulação da resposta imune, foi determinado o perfil endócrino dos participantes controles e pacientes infectados por SAR-CoV-2.

Considerando-se os hormônios adrenais, a COVID-19 levou à redução de 11-diidrocorticosterona (11-DHC) comparando-se a indivíduos não infectados, do sexo masculino (Figura 7A), enquanto as mulheres infectadas com SARS-CoV-2 apresentaram diminuição significativa de cortisol (Figura 7C) e, especialmente, aldosterona (Figura 7D). De forma interessante, a cortisona, cujas concentrações plasmáticas foram mais elevadas no grupo controle, foi significativamente reduzida em ambos os sexos, após a infecção (Figura 7B). A COVID-19 não influenciou nos níveis de adrenosterona, androstenediona ou androsterona, em pacientes do sexo masculino ou feminino (Figuras 7E, F e G, respectivamente).

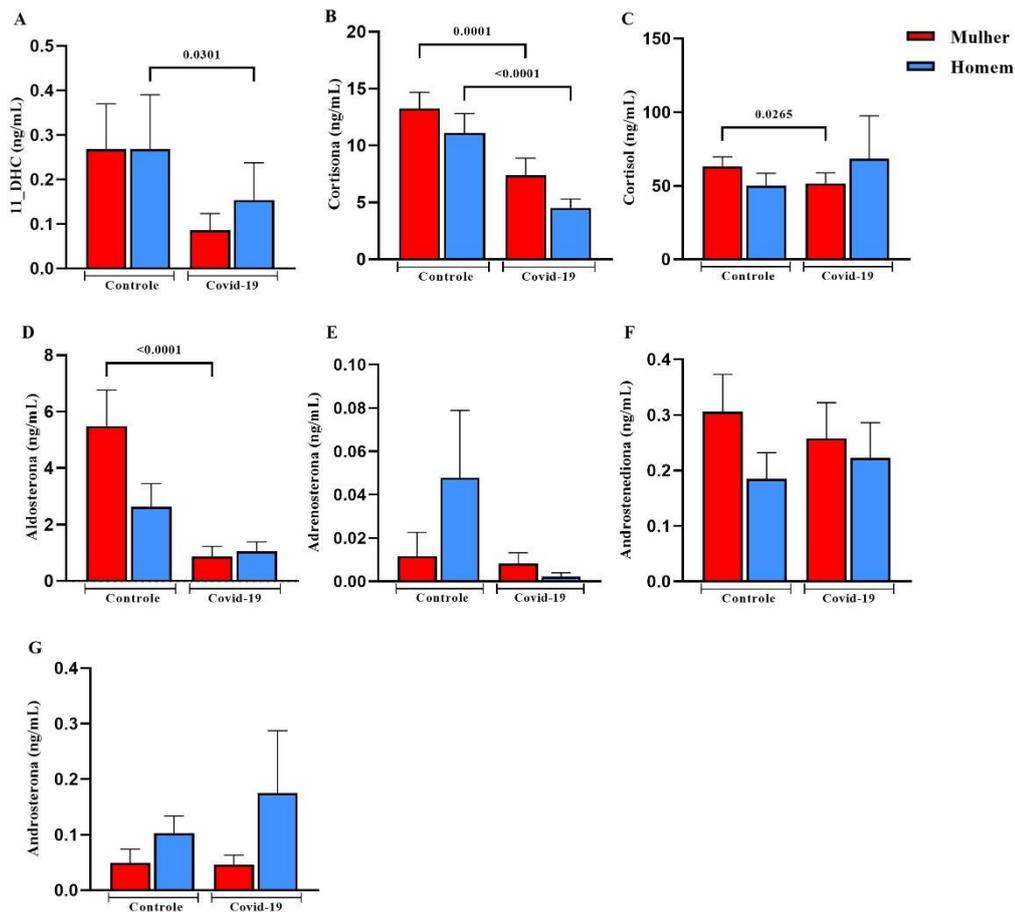


Figura 7. Quantificação de hormônios esteroides adrenais em controles saudáveis e pacientes infectados com SARS-CoV-2. Através da espectrometria de massas, foi possível realizar a análise dos hormônios para determinação da quantificação destes mediadores no plasma de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, do sexo masculino e feminino, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle e 89 mulheres e 109 homens no grupo COVID-19. Os valores exatos de p estão representados na figura.

Ao compararmos os subgrupos de COVID-19, conforme sexo e gravidade, observamos que apenas dois hormônios tiveram alterações relevantes em homens ou mulheres, após ajustes das covariáveis confundidoras. A cortisona, mais elevada em participantes controles, apresentou queda significativa em ambos os grupos não graves e graves, do sexo masculino, sendo que a redução nos homens não graves foi ainda mais significativa que nas mulheres do mesmo grupo (Figura 8B). É importante ressaltar novamente que estes pacientes não diferiram no uso de corticosteroides para tratamento da COVID-19. Por outro lado, a aldosterona manteve-se em níveis mais baixos nas mulheres não graves e graves comparando-se a participantes não infectadas, do sexo feminino, que tiveram este hormônio aparentemente mais elevado que os homens controles (Figura 8D).

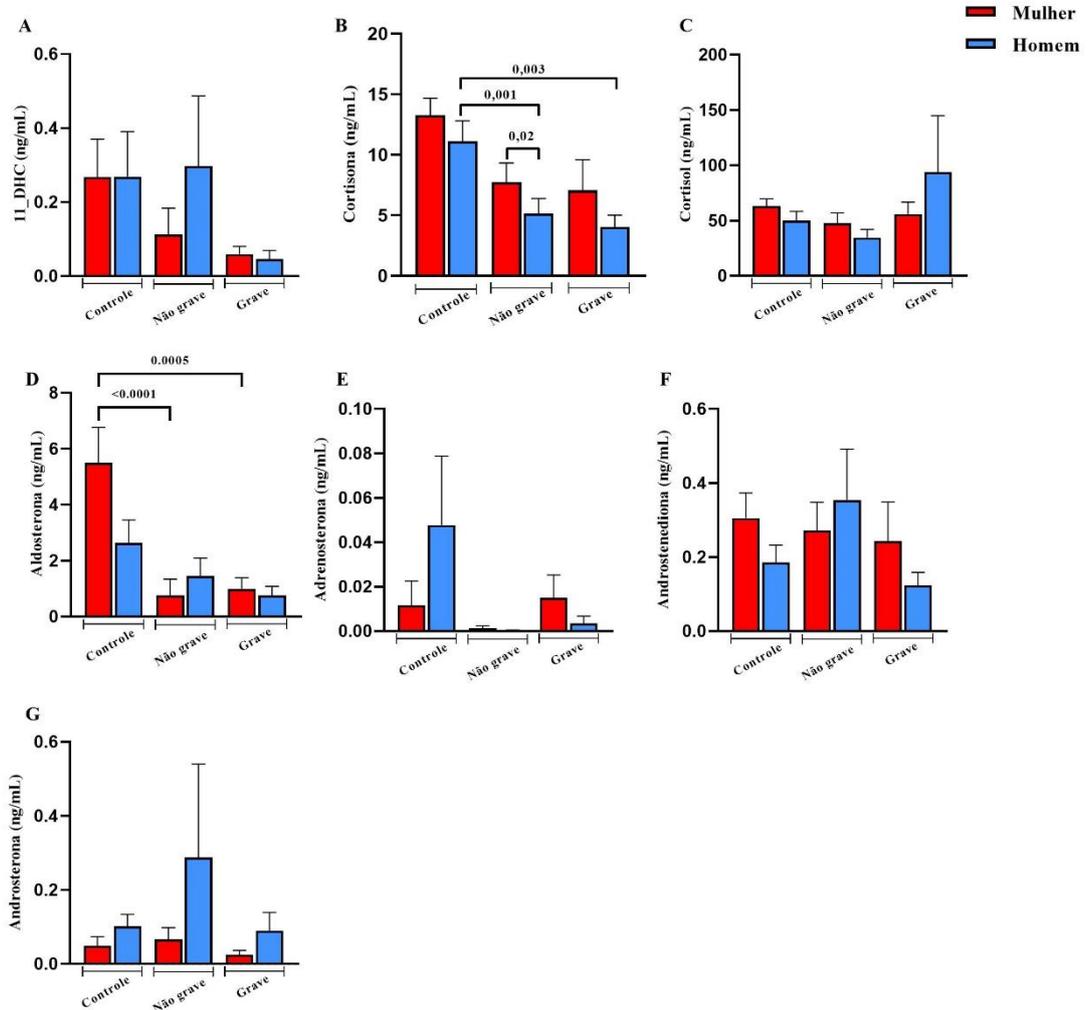


Figura 8. Quantificação de hormônios esteroides adrenais em controles saudáveis e pacientes infectados com SARS-CoV-2, separados em grupos de acordo com a gravidade da doença. Através da espectrometria de massas, foi possível realizar a análise dos hormônios para determinação da quantificação destes mediadores no plasma de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, do sexo masculino e feminino, considerando-se um total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle, 45 mulheres e 47 homens no grupo não grave e 44 mulheres e 62 homens no grupo grave. Os valores exatos de p estão representados na figura.

Em seguida, foram quantificados hormônios que poderiam ter influência direta no dimorfismo sexual, como andrógenos e estrógenos. Os resultados mostraram que, conforme biologicamente esperado, os homens produziram mais testosterona que as mulheres, a despeito da infecção por SARS-CoV-2. Entretanto, os níveis deste hormônio foram substancialmente reduzidos na COVID-19 em pacientes do sexo masculino, o que não ocorreu no sexo feminino (Figura 9A). Em concordância, houve redução de desidroepiandrosterona (DHEA) nos homens com COVID-19, comparados aos controles do mesmo sexo (Figura 9C). De forma interessante houve tendência ao aumento dos níveis do metabólito da testosterona, a di-hidrotestosterona (DHT), nos homens com COVID-19 (Figura 9B).

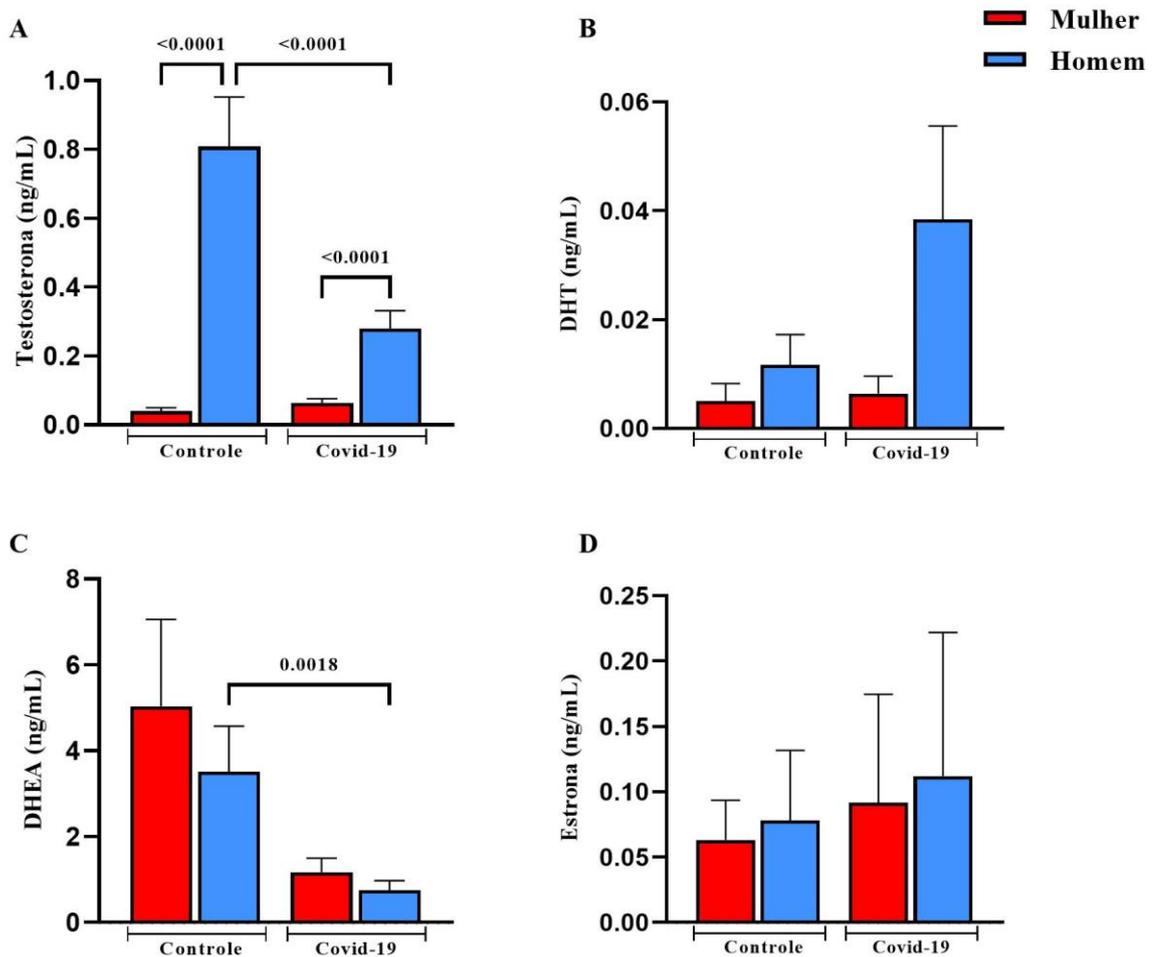


Figura 9. Quantificação de hormônios sexuais em controles saudáveis e pacientes infectados com SARS-CoV-2. Através da espectrometria de massas, foi possível realizar a análise dos hormônios para determinação da quantificação destes mediadores no plasma de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, do sexo masculino e feminino, considerando-se um n total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle e 89 mulheres e 109 homens no grupo COVID-19. Os valores exatos de p estão representados na figura.

Em vista destes resultados e, considerando-se que o envelhecimento e comorbidades podem estar associados à redução de hormônios androgênicos, procedemos às análises da variação hormonal na COVID-19, conforme o sexo e gravidade da doença, ajustando os resultados pelos fatores confundidores já descritos anteriormente. Não se observou diferença significativa nos níveis de DHEA e estrona, em homens ou mulheres, não graves ou graves (Figuras 10 C e D, respectivamente). Entretanto, foi notória a manutenção da baixa testosterona em pacientes do sexo masculino com COVID-19 grave, se assemelhando aos níveis normalmente encontrados no sexo feminino (Figura 10A). Ao contrário, houve uma clara tendência ao aumento de DHT, conforme maior a gravidade da doença, independentemente dos fatores confundidores avaliados neste estudo (Figura 10B). É importante ressaltar que muitos pacientes não tiveram detecção deste hormônio, o que impactou a análise matemática dos dados. Em sequência, avaliamos a inter-relação entre testosterona e DHT nas diferentes formas da COVID-19. Os dados mostraram, mais uma vez, a dinâmica divergente entre estes dois hormônios androgênicos nos homens, mas não nas mulheres infectadas por SARS-CoV-2 (Figura 10 E).

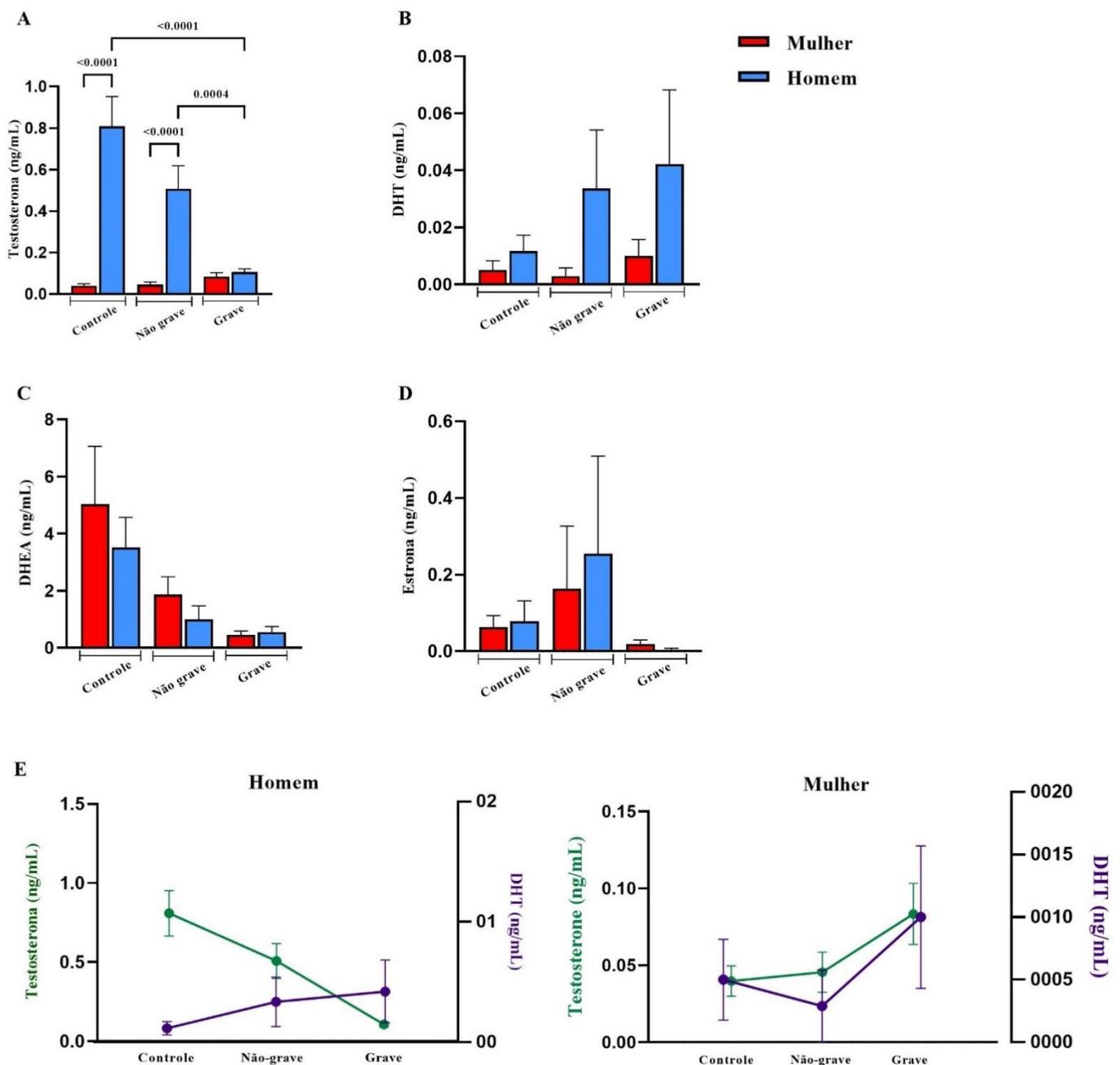


Figura 10. Quantificação de hormônios esteroides sexuais em controles saudáveis e pacientes infectados com SARS-CoV-2, separados em grupos de acordo com a gravidade da doença. Através da espectrometria de massas, foi possível realizar a análise dos hormônios para determinação da quantificação destes mediadores no plasma de indivíduos controles e pacientes com COVID-19, do sexo masculino e feminino. Em (E), comparação entre os níveis de testosterona e DHT entre indivíduos dos 3 grupos, em ambos os sexos, considerando-se um total de 56 mulheres e 36 homens no grupo controle, 45 mulheres e 47 homens no grupo não grave e 44 mulheres e 62 homens no grupo grave. Os valores exatos de p estão representados na figura.

Níveis diminuídos de testosterona ocorreram em paralelo com potentes respostas inflamatórias e com a forma grave da doença. Portanto, também investigamos a correlação entre os parâmetros imunológicos e endócrinos quantificados neste estudo. Nas mulheres, a testosterona não se correlacionou significativamente com os escores da doença (Figura 11A). Por outro lado, houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-6, IL-8, IL-10, frequência de neutrófilos e idade com a gravidade da doença em homens e, mais importante, uma correlação inversa significativa entre os níveis de testosterona com as citocinas ou escore de gravidade da doença (Figura 11B). Estes achados sugerem que existe um papel regulador importante para a testosterona na inflamação associada ao pior desfecho da COVID-19.

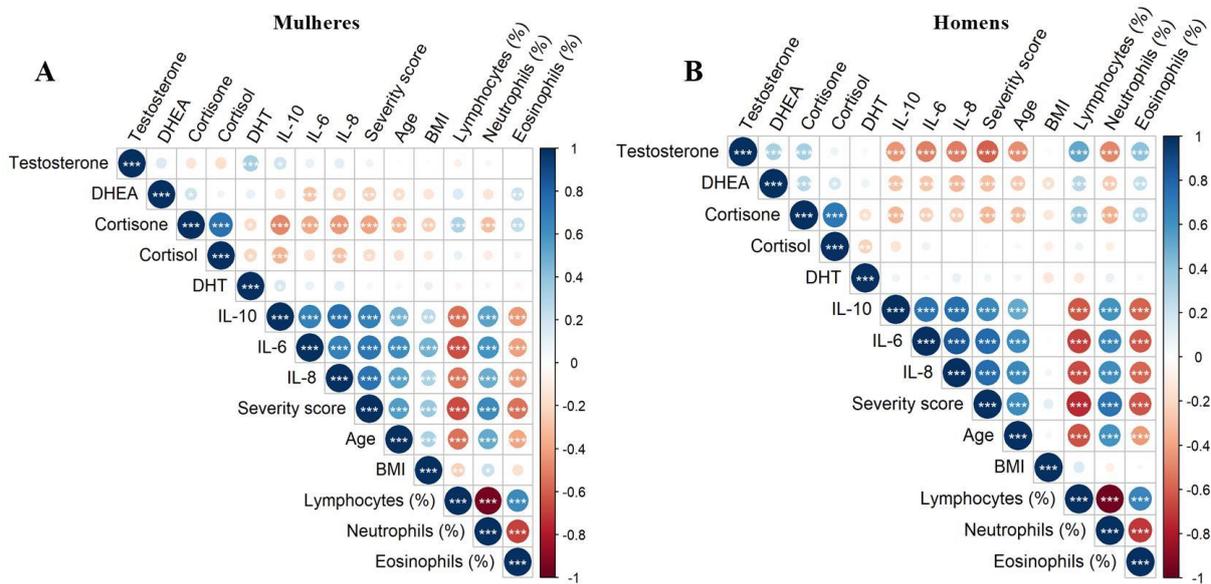


Figura 11. Correlogramas dos parâmetros imunológicos e endócrinos associados à evolução da COVID-19 em indivíduos do sexo feminino e masculino. Vários parâmetros foram comparados, ao mesmo tempo, para identificar correlação entre eles. Entre estes parâmetros estão os hormônios que mais se destacaram no estudo (testosterona, DHEA, cortisona, cortisol e DHT), citocinas que tiveram resultados significativos (IL-10, IL-6 e IL-8), escore clínico, idade, índice de massa corporal (BMI) e células do sistema imunológico (linfócitos, neutrófilos e eosinófilos). Os asteriscos representam correlações significativas, com $p < 0.05$.

5. Discussão

5 Discussão

Muitas perguntas relacionadas à COVID-19 ainda permanecem sem resposta, incluindo o esclarecimento dos mecanismos relacionados ao dimorfismo sexual no desfecho da doença. Neste trabalho, analisamos a interação entre as respostas hormonais e imunológicas, que juntas contribuem para o agravamento da COVID-19 em homens, o que foi possível devido a uma nova e abrangente avaliação. Além disso, nossos achados geraram importantes conhecimentos que podem impactar e contribuir no manejo da COVID-19.

Estudos indicam que a hipertensão é a comorbidade mais frequente entre pacientes com COVID-19.¹⁰⁰ De fato, a análise das comorbidades dos pacientes do nosso estudo corrobora com esses dados. Porém essa frequência não é totalmente surpreendente nem implica necessariamente uma relação causal entre hipertensão e COVID-19 ou sua gravidade, uma vez que a hipertensão é extremamente frequente em idosos. Além disso, as pessoas mais velhas parecem estar particularmente em risco de serem infectadas com SARS-CoV-2 e de experimentar formas graves e complicações da COVID-19.⁹⁹

Um dos medicamentos utilizados para tratamento da COVID-19 grave são os corticoides. Na coorte de pacientes avaliada neste trabalho, a maioria dos pacientes com COVID-19 fazia uso deste medicamento anti-inflamatório. Entretanto, a sua utilização não gerou viés em nossas análises, uma vez que homens e mulheres usaram igualmente este medicamento, enquanto doentes. De fato, desde o início da pandemia, os corticoides vêm sendo mencionados como possível tratamento para os pacientes com COVID-19, por sua conhecida ação eficaz em outras doenças respiratórias e inflamatórias.^{100,101} A tempestade de citocinas é um importante agravante não somente da COVID-19, mas também de outras doenças, e algumas delas são tradicionalmente tratadas com corticoides.^{102,103} Ainda nos primeiros meses da pandemia, foram realizados alguns estudos com corticoides injetáveis como a metilprednisolona, que comprovaram uma menor necessidade de transferência para a UTI após o seu uso, além de também reduzir a mortalidade.¹⁰⁰⁻¹⁰⁷ Em julho de 2020, pesquisadores de Oxford publicaram um grande estudo clínico que demonstrou que o corticoide (dexametasona, tanto oral como injetável) tem de fato um papel importante nos casos graves da COVID-19. O tratamento com corticoide possibilitou que os pacientes em UTI se recuperassem de forma mais rápida do que os pacientes que não tomaram a medicação, além de diminuir a sua mortalidade.¹⁰⁸ Com base neste e em outros novos estudos, que comprovaram a eficácia do corticoide, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em setembro de 2020, passou a incluir a corticoterapia em seu protocolo de tratamento para os pacientes com COVID-19 grave.¹⁰⁹

O desenvolvimento de síndromes respiratórias durante a COVID-19 aumentou a necessidade de uso da ventilação mecânica. Esse súbito aumento da demanda por leitos de UTI e ventiladores abalou, em muitos países, a infraestrutura na área da saúde.¹¹⁰ O uso dos ventiladores promove melhor desempenho de trocas gasosas e diminui o esforço respiratório, podendo ser não invasivo, por meio de uma interface externa, como máscara facial, ou invasivo, através de intubação ou traqueostomia.¹¹¹ Estima-se que 20% dos pacientes diagnosticados com COVID-19 desenvolvem a forma grave da doença, podendo adquirir a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A partir disso, o paciente acaba manifestando uma insuficiência respiratória hipoxêmica aguda e cerca de 42 a 100% desses pacientes necessitam de auxílio respiratório.¹¹² Todas as mulheres e a grande maioria dos homens que participaram do nosso estudo e estavam com COVID-19 grave necessitaram do uso de aparelhos para suporte respiratório.

Estudos mostram que pacientes com COVID-19 apresentam níveis mais elevados de diversas citocinas como IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF. De fato, a gravidade e o desfecho da doença podem estar associados à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, o que conhecemos como tempestade de citocinas, levando à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), conforme descrito anteriormente.¹¹³ No nosso estudo, após a análise dos tipos celulares e concentração de citocinas no plasma de indivíduos controles e pacientes infectados, foi detectada neutrofilia e linfopenia, além do aumento gradativo das citocinas IL-2, IL-6 e IL-8, à medida que a gravidade da doença também foi aumentando. Os níveis séricos de IL-6 são muito mais elevados em pacientes com COVID-19 grave do que em pacientes não infectados ou com a forma grave da doença.³² O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, e o aumento nos níveis séricos deste mediador indicam uma tentativa de controle dos efeitos causados pela inflamação exacerbada na COVID-19.¹¹⁴ De acordo com Napoleão *et al*, 2021,¹¹⁵ a dosagem dos níveis séricos de IL-6 e IL-10 foram considerados preditores da gravidade da doença e pode ser usada para o diagnóstico de pacientes com maior risco de agravamento da doença. Já IL-8 tem como principal ação o grande estímulo migratório para as células do sistema imunológico, principalmente neutrófilos, o que corrobora com a neutrofilia detectada no nosso estudo.¹¹⁴

Em diversas doenças, há uma discrepância nas respostas imunológicas entre homens e mulheres. Durante a COVID-19, os homens são afetados desproporcionalmente, sendo mais suscetíveis à esta infecção e ao desenvolvimento de complicações, resultando muitas vezes na maioria dos casos graves e fatais.⁷⁹ Dentre os diversos papéis dos hormônios esteroides,

destaca-se a regulação das atividades do sistema imune, tanto inato quanto adaptativo.⁵⁷ Há evidências de interações imunoendócrinas relacionadas ao dimorfismo sexual, o que sustenta a ideia de que o sistema endócrino é um fator importante para o desenvolvimento e manutenção das atividades imunológicas.⁷⁸

Os hormônios corticosteroides são induzidos pela exposição a situações estressantes, sejam elas psicológicas, comportamentais ou fisiológicas, como por exemplo doenças inflamatórias. O cortisol e a corticosterona são metabólitos ativos e coexistem em um equilíbrio dualista com seus metabólitos inativos, cortisona e 11_DHC, respectivamente, que exibem efeitos opostos.¹¹⁶ Tan *et al*, 2020, desenvolveram um estudo que mostra que, na COVID-19, pacientes com altos níveis de cortisol no sangue têm maior probabilidade de morte.¹¹⁷ Nossos resultados mostram que, embora os níveis de cortisol não tenham sido significativamente alterados, houve diminuição nos níveis de cortisona e 11_DHC entre os pacientes com COVID-19 grave ou não grave, quando comparados com os controles, principalmente entre os indivíduos do sexo masculino. Essa queda nos níveis de 11_DHC e, notavelmente, de cortisona, parece estar relacionada com o aumento da gravidade da doença, indicando que estes hormônios podem ter alguma ação imunorreguladora.

A aldosterona é um importante mineralocorticoide capaz de regular a homeostase de fluidos e eletrólitos e que, além disso, faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona, importante para o controle da pressão arterial e que tem relação com ACE2, enzima utilizada pelo SARS-CoV-2 para invadir a célula hospedeira.¹¹⁸ Durante a COVID-19, baixos níveis de aldosterona são preditores do aumento da gravidade da doença.¹¹⁹ Em nosso estudo, mostramos que há uma diminuição notável nos níveis deste hormônio entre os pacientes infectados em ambos os sexos, mas principalmente entre as mulheres, após os ajustes dos fatores confundidores. Com esses resultados, podemos supor que a aldosterona poderia ter um papel protetor contra a COVID-19.

Dentre todos os achados, nosso trabalho forneceu fortes evidências de correlações entre a inflamação na COVID-19 e a redução significativa de testosterona em homens com a forma grave da doença. Um estudo anterior já havia demonstrado a relação entre a concentração de testosterona circulante e o agravamento da COVID-19, revelando que essa concentração é muito maior em homens que nunca foram infectados em comparação com aqueles que estavam com a COVID-19 grave no momento da coleta das amostras ou que desenvolveram essa forma grave mais tarde.¹²⁰ De fato, a testosterona é reduzida em homens adultos com pneumonia por COVID-19.¹²¹

No entanto, nosso trabalho é inovador em vários aspectos. Primeiro, nossa coorte foi maior e melhor categorizada (controles saudáveis), com uma avaliação mais rigorosa dos resultados clínicos e mais detalhes sobre as respostas imunoendócrinas dos participantes do estudo, o que garante resultados mais precisos e confiáveis. Em segundo lugar, nossos resultados foram ajustados para excluir a influência da maioria das comorbidades associadas ao agravamento da COVID-19, inclusive a idade, relacionada à redução natural dos hormônios androgênicos nos homens.

As razões dos baixos níveis de testosterona estarem relacionados aos piores desfechos clínicos da COVID-19 grave ainda são incertas. Uma possibilidade é sustentada pelos resultados do trabalho de Leisegang, Henkel e Agarwal, 2019. Segundo este estudo, a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas pode ocorrer após mudanças repentinas de saúde que diminuam os níveis hormonais. Isto ocorre porque as citocinas são conhecidas por fornecer funções reguladoras significativas na esteroidogênese das células de Leydig e nos níveis fisiológicos de testosterona. Desta forma, a inflamação aguda está associada a inibição da síntese de testosterona.¹²² De acordo com estes fatos, poderíamos supor que o SARS CoV-2 atinge o testículo,¹²³ embora a extensão dessa infecção e seu impacto na produção de testosterona ainda não estejam totalmente claros.¹²⁴ Além disso, a concentração de testosterona não é alterada após a recuperação da COVID-19,¹²⁵ validando esta suposição, uma vez que o nível de testosterona gonadal poderia ser restabelecido após a eliminação do vírus.

Outra hipótese diz respeito à metabolização da testosterona em DHT. A testosterona é convertida no corpo em dois metabólitos ativos, 17β -estradiol (E2) e 5α -diidrotestosterona (DHT), que medeiam algumas ações da testosterona nos tecidos-alvo.¹⁰⁶ O DHT possui alto potencial androgênico e afinidade 6 a 10 vezes maior pelo receptor de andrógeno (AR) do que a própria testosterona.¹²⁶ Os níveis de ambos os hormônios tendem a ser altamente correlacionados, como já mostrado em estudos anteriores.¹⁰⁶ No entanto, nossos resultados mostraram que durante a infecção por SARS-CoV-2, pacientes do sexo masculino acometidos com a COVID-19 grave apresentam níveis divergentes de testosterona e DHT. Enquanto os níveis de testosterona tendem a diminuir de acordo com o aumento na gravidade da doença, os níveis de DHT tendem a aumentar, indicando que poderia haver alguma relação entre esses dois hormônios no agravamento da doença. A testosterona, que também exerce papel imunomodulador na inflamação, poderia estar sendo metabolizada em DHT, pelos homens em estado grave, o que reduziria sua capacidade de contra-regular a intensa resposta inflamatória presente nestes pacientes. As ações anti-inflamatórias na testosterona podem ser vistas, por

exemplo, na resposta à vacina contra influenza, em que este hormônio assume um papel imunossupressor.¹²⁷

Ademais, é válido mencionar que o estrógeno, nas mulheres, poderia exercer também um efeito modulador na resposta imune anti-viral, o que evitaria respostas exacerbadas e prejudiciais, tal como acontece de forma mais proeminente nos homens. De fato, a testosterona pode ser metabolizada a estradiol via aromatase, enquanto a DHT já é um metabólito final na esteroidogênese. O papel modulador do estrógeno na resposta anti-viral também já foi identificado, como pode exemplo em um estudo que mostra que o 17β -estradiol elevado protege as mulheres da patogênese do vírus influenza A, suprimindo as respostas inflamatórias.¹²⁸

Uma das limitações do nosso estudo foram os níveis baixos ou indetectáveis de DHT em muitos pacientes. No entanto, o DHT é rapidamente metabolizado nos tecidos e apresenta baixa meia-vida. Sabendo disso, ainda assim é possível considerar os nossos achados importantes e inovadores para a elucidação do papel das interações imunoendócrinas na patogênese da COVID-19.

Finalmente, os dados apontam para a junção de parâmetros imunológicos e hormonais que podem levar ao agravamento da COVID-19 no sexo masculino, o que corrobora para o melhor entendimento da doença e manejo diferencial da COVID-19 entre homens e mulheres infectados pelo vírus SARS-CoV-2.

6. Conclusões

6 Conclusões

- Homens apresentam quadros mais graves de COVID-19
- A tempestade de citocinas inflamatórias na COVID-19 ocorre independentemente do sexo, faixa etária e das principais comorbidades associadas ao agravamento da doença.
- A regulação endócrina via andrógenos na COVID-19 ocorre de forma divergente em homens e mulheres.
- Níveis reduzidos de testosterona são marcadores da doença grave em homens e estão relacionados à desregulação inflamatória da doença.
- A redução de testosterona na COVID-19 grave em homens ocorre de forma independente das principais comorbidades e fatores relacionados ao agravamento da doença.

7. Referências bibliográficas

7 Referências bibliográficas

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* **395**, 497 (2020).
2. Wang, D. *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* **323**, 2 (2020).
3. Zhu, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* **382**, 727-733 (2020).
4. Zhong, N.S. *et al.* Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, In February, 2003. *The Lancet* **362**, 1353 (2003).
5. Zaki, A.M. *et al.* Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* **367**, 1814 (2012).
6. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet* **395**, 507 (2020).
7. Li, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med* **382**, 2 (2020).
8. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology* **5**, 562 (2020).
9. Walls, A.C. *et al.* Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* **180**, 281 (2020).
10. Baughn, L. B. *et al.* Targeting TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection. *Mayo Clin Proc* **95**, 1989 (2020).
11. Thunders, M. & Delahunt, B. Gene of the month: TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). *J Clin Pathol*, 1 (2020).
12. Abbasi, A. Z. *et al.* Spiking dependence os SARS-CoV-2 pathogenicity on TMPRSS2. *J Med Virol* **93**, 4207 (2021).
13. Strope, J. D., Chau, C. H. & Figg, W. D. TMPRSS2: potential biomarker for COVID-19 outcomes. *J Clin Pharmacol.* **60**, 802 (2020).
14. Chan, J.F.W. *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet* **395**, 514 (2020).
15. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak (<https://www.who.int>).
16. Johns Hopkins University & Medicine (<https://coronavirus.jhu.edu/>).
17. Tregoning, J. S. *et al.* Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol* **21**, 626 (2021).
18. Our World in Data (<https://ourworldindata.org/coronavirus>).
19. Li, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol* **92**, 425 (2020).
20. Yuan, H. *et al.* A current emerging respiratory infection: epidemiological and clinical characteristics, diagnosis and treatments of COVID-19. *The Lancet*, 5 (2020).
21. Fung, S. Y. *et al.* A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses. *Emerging Microbes & Infections* **9**, 558-568 (2020).

22. Li, X. *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **10**, 104 (2020).
23. Groeneveld, A. B. J. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascular Pharmacology* **39**, 252 (2003).
24. Barnes, B. J. *et al.* Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* **217**, 1 (2020).
25. Rokni, M., Ghasemi, V. & Takavoli, Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol.* **30**, 1-6 (2020).
26. Prompetchar, E., Keltoy, C. & Palaga, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol* **38**, 1-9 (2020).
27. D'Acquisto, F., Maione, F. & Rbeil, M. P. From IL-15 to IL-33: the never-ending list of new players in inflammation. Is it time to forget the humble aspirin and move ahead? *Biochemical Pharmacology* **79**, 226-22- (2010).
28. Yazdanpanah, F., Hamblin, M. R. & Rezaei, N. The immune system and COVID-19: Friend or foe? *Life Sciences* **256**, 2-3 (2020).
29. Wan, S. *et al.* Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *British Journal of Haematology* **189**, 434 (2020).
30. Liu, J. *et al.* Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMEedicine* **55**, 5 (2020).
31. Channappanavar, R. & Perlman, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol* **39**, 532 (2017).
32. Montazersaheb, S. *et al.* COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal* **19**, 2 (2022).
33. Wang, Y. *et al.* Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol* **92**, 571 (2020).
34. Favalli, E. G. *et al.* COVID-19 infection and rheumatoid arthritis: Faraway, so close! *Autoimmunity Reviews* **19**, 2 (2020).
35. Husmann, J. P. Cellular and molecular pathways of COVID-19 and potential points of therapeutic intervention. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 2 (2020).
36. Zuo, Y. *et al.* Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight* **5**, 1 (2020).
37. Hu, B., Huang, S. & Yin, L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* **93**, 251-252 (2021).
38. 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* **46**, 846 (2020).
39. Merad, M. & Martin, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* **20**, 355 (2020).
40. Mangalmurti, N. & Hunter, C. A. Cytokine storms: understanding COVID-19. *Immunity* **53**, 19 (2020).
41. Miller, W. L. & Auchus, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* **32**, 82 (2011).
42. Hughes, C. R, Man, E. & Achermann, J.C. The adrenal cortex and its disorders. Brook's Clinical Pediatric Endocrinology. 7th ed. MT Dattani & CGD Brook, editors. NY, USA: John Wiley & Sons; 2020. p. 335-407.

43. Bacila, I.A., Elder, C. & Krone, N. Update on adrenal steroid hormone biosynthesis and clinical implications. *Arch Dis Child*. **104**, 1223-1228 (2019).
44. Miller, W.L. Steroidogenesis: unanswered questions. *Trends Endocrinol Metab*. **28**, 791-793 (2017).
45. Holst, J. P. *et al*. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* **24**, 105-108 (2004).
46. Kater, C. E., Giorgi, R. B. & Barbosa, F. A. C. Classic and current concepts in adrenal steroidogenesis: a reappraisal. *Arch Endocrinol Metab*. **66**, 78-80 (2022).
47. Storbeck, K.H. *et al*. Steroid metabolome analysis in disorders of adrenal steroid biosynthesis and metabolism. *Endocr Rev*. **40**, 1605-1625 (2019).
48. Miller, W.L. A brief history of adrenal research: steroidogenesis – the soul of the adrenal. *Mol Cell Endocrinol*. **371**, 5-14 (2013).
49. Becker, K.L. *et al*. Principles and practice of endocrinology and metabolism. 3rd edition on CD-ROM. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.
50. Ravel, R. Clinical laboratory medicine. 6th edition. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.; 1995.
51. Guyton, A.C. & Hall, J. Textbook of medical physiology. 9th edition. W.B. Saunders Co.; 1996.
52. Wilhelmson, A. S. *et al*. Testosterone is an endogenous regulator of BAFF and splenic B cell number. *Nat Commun*. **9**, 1-2 (2018).
53. Borghetti, P. *et al*. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **130**, 142 (2009).
54. Taub. D. D. Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunol* **252**, 1-2 (2008).
55. Medeiros, S. F., Maitelli, A. & Nince, A. P. B. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* **29**, 599 (2007).
56. Madden, K. S. & Felten, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiological Reviews* **75**, 77 (1995).
57. Pállinger, E. & Csaba, G. A hormone map of human immune cells showing the presence of adrenocorticotrophic hormone, triiodothyronine and endorphin in immunophenotyped white blood cells. *Immunology* **123**, 584 (2007).
58. Bupp, M. R. G. & Jorgensen, T. N. Androgen-induced immunosuppression. *Frontiers in Immunology* **9**, 4-5 (2018).
59. Butterworth, M., McClellan, B. & Aklansmith, M. Influence of sex on immunoglobulin levels. *Nature* **214**, 1224-1225 (1967).
60. Von Hamm. E, R. I. The Effect of Estrone on Antibody-Production. *J Immunol.*, 1942.
61. Mangalam, A. K., Taneja, V. & David, C. S. HLA class II molecules influence susceptibility versus protection in inflammatory diseases by determining the cytokine profile. *The Journal of Immunology* **190**, 513–519 (2013).
62. Ngo, S. T., Steyn, F. J.& McCombe, P. A. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* **35**, 347–369 (2014).
63. Ziegler, S. & Altfeld, M. Sex differences in HIV-1-mediated immunopathology. *Current Opinion in HIV and AIDS* **11**, 209–215 (2016).
64. Larrauri, A. & De Mateo, S. Characterisation of swabbing for virological analysis in the Spanish Influenza Sentinel Surveillance System during four influenza seasons in the period 2002-2006. *Euro Surveill* **12**, 2007.

65. Crichton, E. J. *et al.* An exploratory spatial analysis of pneumonia and oainfluenza hospitalizations in Ontario by age and gender. *Epidemiology and Infection* **135**, 253–261 (2007).
66. Arima, Y. & Vong, S. Human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China: preliminary assessments of the age and sex distribution. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR* **4**, 1–3 (2013).
67. Wang, X. L. *et al.* Age and sex differences in rates of influenza-associated hospitalizations in Hong Kong. *American Journal of Epidemiology* **182**, 335–344 (2015).
68. Karlberg, J., Chong, D. S. Y. & Lai, W. Y. Y. Do men have a higher case fatality rate of severe acute respiratory syndrome than women do? *American Journal of Epidemiology* **159**, 229–231 (2004).
69. Channappanavar, R. *et al.* Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *The Journal of Immunology* **198**, 4046–4053 (2017).
70. Alghamdi, I. G. *et al.* The pattern of Middle east respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: A descriptive epidemiological analysis of data from the Saudi Ministry of Health. *International Journal of General Medicine*, v. 7, p. 417–423, 2014.
71. Furman, D. *et al.* Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 869–874 (2014).
72. Berghöfer, B. *et al.* TLR7 ligands induce higher IFN- α production in females. *The Journal of Immunology* **177**, 2088–2096 (2006).
73. Hannah, M. F., Bajic, V. B. & Klein, S. L. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain, Behavior, and Immunity* **22**, 503–516 (2008).
74. Fijak, M. *et al.* Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. *The Journal of Immunology* **186**, 5162 (2011).
75. Holroyd, C. R. & Edwards, C. J. The effects of hormone replacement therapy on autoimmune disease: rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Climacteric* **12**, 379 (2009).
76. Baillargeon, J. *et al.* Hypogonadism and the risk of rheumatic autoimmune disease. *Clin Rheumatol.* **35**, 4 (2016).
77. Manuel, R. S. J. & Liang, Y. Sexual dimorphism in immunometabolism and autoimmunity: Impact on personalized medicine. *Autoimmunity Reviews* **20**, 2 (2021).
78. Bharadwaj, S., Kulkarni, G. & Shen, B. Menstrual cycle, sex hormones in female inflammatory bowel disease patients with and without surgery. *Journal of Digestive Diseases* **16**, 252 (2015).
79. Global Health 5050. The Sex, Gender and COVID-19 Project. <https://globalhealth5050.org/the-sex-gender-and-covid-19-project/> (Acesso em 29 de junho de 2021).
80. Global Health 5050. The Sex, Gender and COVID-19 Project. <https://globalhealth5050.org/wp-content/uploads/November-2021-data-tracker-update.pdf> (Acesso em 13 de janeiro de 2022).
81. Global Health 5050. The Sex, Gender and COVID-19 Project. Gender and sex -disaggregated data: Vital to inform an effective response to COVID-19. (Acesso em 13 de janeiro de 2022).
82. Bechmann, N. *et al.* Sexual dimorphism in COVID-19: potential clinical and public health implications. *Lancet Diabetes Endocrinol* **10**, 221 (2022).
83. Takahashi, T. *et al.* Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature* **588**, 315-320 (2020).

84. Global Health 5050. The Sex, Gender and COVID-19 Project. <https://globalhealth5050.org/the-sex-gender-and-covid-19-project/men-sex-gender-and-covid-19/> (Acesso em 13 de janeiro de 2022).
85. Zhao, R. *et al.* A GPR174-CCL21 module imparts sexual dimorphism to humoral immunity. *Nature* **577**, 416-420 (2020).
86. Mehta, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **395**, 1033-1034 (2020).
87. Hoffmann, M., Weber, H. K. & Pohlmann, S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell* **78**, 779-784 (2020).
88. Afar, D.E. *et al.* Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res* **61**, 1686-1692 (2001).
89. Guan, W.J. *et al.* Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID 19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J* **55**, (2020).
90. Williamson, E.J. *et al.* Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430-436 (2020).
91. Lucas, C. *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* **584**, 463-469 (2020).
92. Wang, Y. *et al.* Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. *Clin Chim Acta* **436**, 263-267 (2014).
93. Peti, A.P.F. *et al.* High-resolution multiple reaction monitoring method for quantification of steroidal hormones in plasma. *J Mass Spectrom* **53**, 423-431 (2018).
94. Montgomery, D.C. Design and analysis of experiments: John wiley & sons (2017).
95. Chen, Y. *et al.* Aging in COVID-19: vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Res Rev.* **65**, 1 (2021).
96. Bienvenu, L. A. *et al.* Higher mortality of COVID-19 in males: sex differences in immune response and cardiovascular comorbidities. *Cardiovascular Research*, 1 (2020).
97. Ghazizadeh, Z. *et al.* Androgen regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men. *bioRxiv*, 3 (2020).
98. Deng, Q. *et al.* Targeting androgen regulation of TMPRSS2 and ACE2 as a therapeutic strategy to combat COVID-19. *iScience* **24**, 1 (2021).
99. Schiffrin, E. L. *et al.* Hypertension and COVID-19. *Am J Hypertens.* **33**, 1 (2020).
100. Wang, Y. *et al.* Early, low-dose and short-term application of corticosteroid treatment in patients with severe COVID-19 pneumonia: single-center experience from Wuhan, China. *MedRxiv*, 3 (2020).
101. Veronese, N. *et al.* Use of corticosteroids in coronavirus disease 2019 pneumonia: a systematic review of the literature. *Frontiers in Medicine* **7**, 2 (2020).
102. Siddiqi, H. K. & Mehra, M. R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant.* **39**, 405-407 (2020).
103. Fang, X. *et al.* Low-dose corticosteroid therapy does not delay viral clearance in patients with COVID-19. *J Infect.* **81**, 147-178 (2020).
104. Wu C, *et al.* Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* **180**, 934-943 (202).

105. Ye, Z. *et al.* Efficacy and safety of corticosteroids in COVID-19 based on evidence for COVID-19, other coronavirus infections, influenza, community-acquired pneumonia and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *CMAJ*. **192**, E756-E767 (2020).
106. Majmundar, M. *et al.* Efficacy of corticosteroids in non-intensive care unit patients with COVID-19 pneumonia from the New York Metropolitan region. *PLoS One* **15**, e0238827 (2020).
107. Fadel R. *et al.* Early short-course corticosteroids in hospitalized patients with COVID-19. *Clin Infect Dis*. **71**, 2114-2120 (2020).
108. RECOVERY Collaborative Group. *et al.* Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 – Preliminary Report. *N Engl J Med*. **384**, 693-703 (2020).
109. The WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group. Association between administration of systemic corticosteroids and mortality among critically ill patients with COVID-19: a meta-analysis. *JAMA* **324**, 1330-1341 (2020).
110. Up to date. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, clinical features, diagnosis, and prevention. https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-epidemiology-virology-clinical-features-diagnosis-and-prevention?search=ventilators%20in%20COVID-19%20pandemic&source=search_result&selectedTitle=5~150&usage_type=default&display_rank=5#H3504376427. (Acesso em 26 de julho de 2022).
111. Up to date. Noninvasive ventilation in adults with acute respiratory failure: Practical aspects of initiation. https://www.uptodate.com/contents/noninvasive-ventilation-in-adults-with-acute-respiratory-failure-practical-aspects-of-initiation?search=noninvasive%20ventilation&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1. (Acesso em 26 de julho de 2022).
112. Up to date. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Critical care and airway management issues. <https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-critical-care-and-airway-management-issues#H4080233186>. (Acesso em 26 de julho de 2022).
113. Tufan, A., Guler, A. A. & Matucci-Cerinic, M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. *Turk J Med Sci* **50**, 620-623 (2020).
114. Varella, P. P. V. & Forte, W. C. N. Cytokines: a review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* **24**, (2001).
115. Napoleão, R. N. M. *et al.* COVID-19: compreendendo a “tempestade de citocinas”. *Research, Society and Development* **10**, 1 (2021).
116. Peti, A. P. F. *et al.* High-resolution multiple reaction monitoring method for quantification of steroidal hormones in plasma. *J Mass Spectrom* **53**, 423-431 (2018).
117. Tan, T. *et al.* Association between high serum total cortisol concentrations and mortality from COVID-19. *The Lancet* **8**, 659-660 (2020).
118. Fourkiotis, V. G. *et al.* Aldosterone and the kidney. *Horm Metab Res* **44**, 194 (2012).
119. Akin, S. *et al.* A low aldosterone/renin ratio and high soluble ACE2 associate with COVID-19 severity. *Journal of Hypertension* **40**, 606-612 (2012).
120. Dhindsa, S. *et al.* Association of circulating sex hormones with inflammation and disease severity in patients with COVID-19. *JAMA Netw Open* **4**, e2111398 (2021).
121. Okcelik, S. COVID-19 pneumonia causes lower testosterone levels. *Andrology* **53**, e13909 (2021).
122. Leisegang, K., Henkel, R. & Agarwal, A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *Am J Reprod Immunol* **82**, e13178 (2019).

123. Costa, M. J. C. *et al.* SARS-CoV-2 infects, replicates, elevates angiotensin II and activates immune cells in human testes. *medRxiv* (2022).
124. Ma, X. *et al.* Pathological and molecular examinations of postmortem testis biopsies reveal SARS-CoV-2 infection in the testis and spermatogenesis damage in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* **18**, 487-489 (2021).
125. Xu, H. *et al.* Effects of SARS-CoV-2 infection on male sex-related hormones in recovering patients. *Andrology* **9**, 107-114 (2021).
126. Wu, F.C. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin. Chem.* **43**, 1289-1292 (1997).
127. Furman, D. *et al.* Systems analysis of sex differences reveals an immunosuppressive role for testosterone in the response to influenza vaccination. *PNAS* **111**, 869-874 (2014).
128. Robinson, D. P. *et al.* Elevated 17 β -Estradiol Protects Females from Influenza A Virus Pathogenesis by Suppressing Inflammatory Responses. *Plos Pathogens* **7**, e1002149 (2011).

8. Anexo I

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-COV2

Pesquisador: Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 6

CAAE: 30525920.7.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.176.358

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1584077_E2.pdf, de 23/07/2020).

INTRODUÇÃO

A maioria significativa dos casos de COVID-19 que cursa com complicações tem ocorrido em pacientes homens, idosos e/ou que já se apresentavam com doenças de base^{1,2}, que inclui obesidade e síndrome metabólica, cuja incidência é alta no Brasil³. Também já é sabido que os casos com complicações graves apresentam a "tempestade de citocinas"^{4,5}, sendo a base da terapia proposta que emprega hidroxicloroquina⁶. A transição em curso da incidência do COVID-19 da população chinesa e europeia para a população das Américas representa uma oportunidade para avaliar comparativamente diversos aspectos dos perfis imunes das populações e os respectivos desfechos clínicos. Essas populações apresentam perfis sócio-econômicos, culturais e epidemiológicos distintos que afetam sobremaneira alguns aspectos da imunidade⁷ que propomos estudar, como perfis de N-glicanas de Fcs de IgGs, além de mediadores anti- ou pró-inflamatórios e o entendimento da maior gravidade de COVID-19 no sexo masculino. Dessa forma, uma vez que os dados epidemiológicos divulgados até então enfatizam a necessidade de investigar perfis

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

imunológicos em todas as populações afetadas por essa pandemia, neste estudo poderemos fazer comparações informativas sobre os desfechos clínicos da COVID-19 em diferentes idades, sexo e condições sociais, no Brasil.

1.1. Padrões moleculares associados a anticorpos: perfis de Nglicanas de Fcs de IgGs, de biomarcadores de inflamação e padrões de anticorpos anti-carboidratos. Conforme os perfis de N-glicanas nas porções Fcs, as IgGs intermedeiam não somente proteção ou patologias, mas também sinais pró- ou anti-inflamatórios^{8,9}. N-glicanas nas Fcs afetam como essas regiões interagem com e sinalizam por meio dos FcRs¹⁰; esses perfis participam de diversos fenômenos biológicos pertinentes às IgGs. Além disso, o próprio patógeno pode controlar o perfil de N-glicanas da porção Fc de IgG. Tais aspectos foram recentemente revistos pela pesquisadora Galit Alter com foco especial nas infecções virais e bacteriana¹¹. Um aspecto a destacar é que a eficácia do tratamento com gamaglobulina endovenosa (IVIG), que vem sendo empregado para tratar casos graves de COVID-19, depende do grau de sialilação das Fcs¹². A remoção do ácido siálico por neuraminidase elimina a eficácia do IVIG que agiria modulando a inflamação mediada por interações entre Fcs de IgGs e FcRs. Outro aspecto sobre perfis de N-glicanas de Fcs de IgGs que poderá ser relevante no COVID-19 é que o grau de sialilação decai com a idade^{7,13-15}. Por fim, embora nada ainda tenha sido descrito quanto a algum papel da testosterona nos perfis de N-glicanas, já é sabido que os níveis hormonais de progesterona também afetam os perfis de N-glicanas das Fcs de IgGs¹⁶. O papel da imunidade humoral na COVID-19 é controverso e pode estar associado a prognósticos positivos ou negativos. Pacientes com quadro grave podem apresentar padrões de ativação de células B extrafoliculares característicos de processos autoimunes e uma redução de populações de células B relacionadas a um bom prognóstico¹⁷. Curiosamente, crianças e jovens apresentam um melhor desfecho da COVID-19 em relação aos adultos e isto pode estar associado a produção de anticorpos naturais do tipo IgM por células B de memória CD27^{dull}^{18,19}. A participação da imunidade humoral na proteção contra COVID-19 pode ser ilustrada pela eficácia da terapia com plasma convalescente em pacientes com casos graves²⁰. Ainda, foi demonstrado que moléculas da imunidade inata local que reconhecem carboidratos, como anticorpos e lectinas, podem ser importantes na proteção contra o SARSCoV-221. Nesta linha, foi demonstrado que a redução da secreção salivar pode ser um potencial fator de risco para a infecção por SARS-CoV-2, pois a hipossalivação prejudica a manifestação de ações antivirais salivares mediadas por várias categorias de moléculas incluindo glicanas e anticorpos naturais²². Neste trabalho, serão analisadas amostras de saliva e plasma de pacientes com diferentes quadros clínicos visando a busca por padrões de anticorpos naturais anti-carboidratos

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Página 02 de 14

Continuação do Parecer: 4.176.358

com significância clínica.

1.2. Perfis de hormônios esteroides e sexuais:

Várias evidências indicam que COVID19 apresenta-se de forma mais grave e com maior letalidade em homens²³, provavelmente devido a fatores relacionados ao gênero, incluindo as diferenças na resposta imune entre os sexos²⁴. De fato, existe um dimorfismo no status imunológico entre homens e mulheres, ressaltado pelas diferenças na incidência, vulnerabilidade e mortalidade²⁵ em doenças autoimunes, cânceres e infecções, relacionando o papel de hormônios sexuais com a modulação da resposta imunológica²⁶. Em relação à testosterona, que é principalmente produzida em homens, sabe-se que ela regula negativamente a citocina BAFF, um fator essencial para a ativação de linfócitos B, durante a produção de anticorpos²⁷. Estes achados corroboram estudos de décadas atrás, que já apontavam para a maior capacidade de mulheres em produzir imunoglobulinas^{28,29}, o que supostamente está relacionado com a sua aumentada reatividade imunológica e resistência a doenças infecciosas, como as virais^{30,31}. Por exemplo, na infecção por HIV, a carga viral em mulheres é mais baixa que em homens na infecção aguda³². A prevalência e suscetibilidade a outras infecções causadas por vírus são também mais altas nos homens que nas mulheres. Por exemplo, em humanos, a influenza provoca reações mais graves e hospitalização em pacientes do sexo masculino^{33,34}, assim como na gripe aviária (H7N9)^{35,26}, gripe suína (H1N1)³⁶, síndrome respiratória aguda grave (SARS)^{37,38} e síndrome respiratória do oriente médio (MERS)³⁹. Mulheres também apresentam níveis mais altos de anticorpos à vacinação para influenza e maior produção de citocinas inflamatórias em comparação aos homens, que por sua vez têm regulação positiva da expressão de um cluster de genes relacionados com a biossíntese de lipídios, induzido por testosterona e relacionado à baixa atividade de anticorpos neutralizantes contra o vírus⁴⁰. Ainda, as respostas imunes mais vigorosas das mulheres podem levar à redução da carga de patógenos e acelerar a eliminação dos mesmos, por mecanismos dependentes da maior expressão de genes associados às vias de Toll-like receptors (TLR) e respostas antivirais do interferon tipo I (IFN)^{41,42}.

1.3. Perfis de mediadores lipídicos, esfingolipídios e ceramidas:

Estudos recentes mostraram que os mediadores lipídicos, prostaglandina E2 (PGE2) e leucotrieno B4 (LTB4), de maneira oposta regulam a produção da citocina inflamatória IL-1, no escorpionismo, e determinam a gravidade do edema pulmonar e a mortalidade. Enquanto PGE2 potencia, o LTB4 inibe, a produção de IL-1, que é uma das citocinas principais no edema pulmonar induzido pela peçonha de escorpião⁴³. Além disso, foi mostrado que os receptores TLR da imunidade inata (como TLR2, TLR4), o CD36 e o CD14, regulam a produção destes eicosanoides^{44,45}. Também foi

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.176.358

mostrado que células mononucleares do sangue circulante de humanos (PBMC) produzem IL-1 quando estimuladas pela peçonha de escorpião, e que o uso de anti-inflamatórios como indometacina ou dexametasona, inibem de modo distinto a produção da IL-145. No entanto, nada se sabe sobre a regulação por eicosanoides, das citocinas entre elas a IL-1, que possivelmente estão presentes na tempestade de citocinas em pacientes com COVID-19, mediando o edema pulmonar. Os esfingolipídios compõem a segunda maior classe de lipídios de membrana. Esses lipídios são importantes moléculas sinalizadoras, que estão envolvidas em processos celulares como crescimento celular, sobrevivência, migração de células imunes, integridade vascular e epitelial, e possuem papel especial na inflamação e no câncer. A ceramida, esfingosina e esfingomielina, dentre vários metabólitos, fazem parte desse grande complexo⁴⁶⁻⁴⁸. A ceramida está envolvida na regulação de processos biológicos fundamentais como respostas ao estresse, senescência celular e apoptose⁴⁹. Sua síntese, independente do mecanismo de formação, ocorre em resposta a fatores indutores de estresse, como: fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento neural (NGF), interleucina-1 (IL-1), 1,25-dihidroxivitamina D3, estresse ambiental (calor e radiação ultravioleta), agentes quimioterapêuticos, antígeno Fas e senescência celular^{50,51}. Ao ser metabolizada, a ceramida originará diferentes esfingolipídios, sendo que sua fosforilação pela ação da enzima ceramida quinase (CERK) levará à formação da ceramida-1-fosfato (C1P)⁵². A C1P desempenha funções em processos celulares como fagocitose, proliferação, migração e sobrevivência celular, além de possuir propriedades anti-apoptóticas e ser importante na mediação da resposta pró-inflamatória⁵³. A deacilação da ceramida pela ceramidase (ACER) dará origem à esfingosina, que pode ser revertida em ceramida pela ceramida sintase (CerS) ou ser fosforilada pelas esfingosina quinases (SPHKs) produzindo a esfingosina-1-fosfato (S1P)⁵¹. Foi demonstrado que a S1P desempenha atividades como regulação da motilidade e invasão celular, angiogênese e maturação vascular, migração de linfócitos e regulação imune, além de estar relacionada com o câncer, alergias, aterosclerose e doenças autoimunes⁵⁴. Ainda, a S1P pode se ligar ao receptor de TNF associado ao fator 2 (TRAF2) e estimular a atividade da ubiquitina ligase (E3), importantes na ativação da via sinalizadora do fator nuclear kappa B (NF-B), que está envolvida em processos celulares inflamatórios⁵⁵. O S1P1 é o receptor de S1P mais estudado e tem função importante no controle da migração de várias células do sistema imune, como linfócitos, células natural killers (NKT), células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e osteoclastos⁵⁶. Porém, a produção e função dos esfingolipídios, ceramidas e derivados metabólicos na infecção por Covid-19 é alvo inédito de investigação.

1.4. Perfil genético do hospedeiro:

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

A susceptibilidade/resistência genética a infecções, apesar de ser um binômio complexo, é observada em uma variedade de doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares, como Hanseníase, Malária, Hepatites B e C ou AIDS e SARS-CoV-257-59. Ademais, o fato da maioria das doenças infecciosas apresentar a característica de apenas uma pequena porção dos infectados desenvolver a doença e o restante permanecer assintomáticos é uma indicação importante sobre a contribuição do componente genético do hospedeiro no desfecho clínico das infecções⁶⁰. Portanto, fatores genéticos do hospedeiro podem contribuir para a casuística e progressão da COVID-19. Até o momento da redação dessa proposta, nenhum estudo que avaliasse a variabilidade genética de indivíduos infectados por SARS-CoV-2 foi publicado, mas iniciativas internacionais de estudos sobre a susceptibilidade genética do hospedeiro ao novo coronavírus já estão em andamento em diversos países.

1.5. Biossegurança no trabalho com SARS-CoV-2:

Há grande preocupação com a segurança ambiental e ocupacional no trabalho com o SARS-Cov-2. Para se trabalhar com o cultivo de vírus há necessidade de estruturas físicas NB-365. Estas salas são de construções com alto custo de equipamentos e edificação. Uma alternativa para conduzir as atividades com partículas virais em maior segurança e menor custo é o uso de partículas pseudotipadas que expressam na sua superfície componentes virais. Essas partículas são importantes para o estudo das interações entre o vírus e suas células alvo, assim como as interações entre vírus e anticorpos.

HIPÓTESE

- Os perfis de N-glicanas nas Fcs de IgGs e de anticorpos anti-carboidratos estão associados à evolução das infecções por SARS-COV2 e participam desses desfechos clínicos.
- Os perfis dos hormônios esteroides e sexuais estão associados à evolução das infecções por SARS-COV2 e participam desses desfechos clínicos.
- Os perfis de citocinas, dos eicosanoides, endocanabinoides, esfingolipídios e ceramidas ou outros mediadores imunoendócrinos estão associados à evolução das infecções por SARS-COV2 e participam desses desfechos clínicos.
- A composição genética do hospedeiro está associada à evolução das infecções por SARS-COV2.

METODOLOGIA

Para esta pesquisa, serão selecionados 5 grupos de participantes, conforme a seguir. (G1): indivíduos provenientes da comunidade USP-Campus Ribeirão Preto, com teste molecular pós-

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

swab nasofaríngeo negativo, autodeclarados saudáveis e assintomáticos (controles). (G2): indivíduos provenientes de buscas domiciliares após consulta de prontuários e acesso aos exames realizados pelas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Ribeirão Preto (via sistema Hygia) ou por chamamento público e auto declaração, que sejam assintomáticos ou oligossintomáticos e com resultado positivo para o teste molecular de SARS-COV2. (G3) e (G4): pacientes atendidos em hospital privado/filantrópico da mesma cidade (Hospital São Paulo, Hospital da Unimed e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto), que serão testados (via swab e RT-PCR), avaliados clínica e laboratorialmente para o diagnóstico da doença, pelos médicos responsáveis pelo atendimento. A gravidade da COVID-19 será utilizada como parâmetro para classificação dos grupos G3 e G4 (doentes sintomáticos hospitalizados moderados e graves, respectivamente). Um último grupo, denominado G5, será constituído por participantes convalescentes e com busca domiciliar, comprovadamente com teste molecular positivo prévio para o vírus nos últimos 180 dias (informação acessada via sistema Hygia), anteriormente à coleta de sangue e que já não apresentam mais sinais ou sintomas da doença. Após a concordância e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os indivíduos dos grupos G1, G2 e G5 serão convidados a responder questionário com informações sociodemográficas, clínicas, antropométricas e comportamentais (podendo ser realizado presencialmente ou por ligação telefônica/vídeo-chamada). Os dados de G3 e G4 serão obtidos via prontuário hospitalar. Dos 5 grupos, serão colhidas amostras de sangue venoso. Exames hematológicos e bioquímicos serão realizados no Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP. Será obtida saliva dos grupos G1, G2, G3 e G5. Nos pacientes G4, intubados em unidade de tratamento intensivo (UTI), iremos obter o Aspirado de Fluido Pulmonar (AFP), por aspiração via cateter traqueal por um profissional da unidade hospitalar, para posterior obtenção de macrófagos alveolares e líquido surfactante. Para os participantes de G1, G2 e G5, a obtenção de amostras biológicas ocorrerá apenas uma vez durante o projeto. Para G3, a obtenção de sangue e saliva ocorrerá no momento de admissão/confirmação de infecção por SARS-CoV-2 no hospital e após 48h. Os pacientes sintomáticos graves (G4), terão amostra de sangue e AFP colhidas na admissão/confirmação de infecção por SARS-CoV-2 e após 48h, seguido por coletas subsequentes a cada 7 dias, até o desfecho. O sangue será centrifugado para obtenção de plasma e leucócitos (buffy coat). As células obtidas serão imediatamente congeladas em reagentes preservadores de ácidos nucleicos, para extração de RNA e análise transcriptômica de expressão gênica. Será também realizada extração de DNA para identificação de polimorfismos genéticos pelo sequenciamento do exoma, metilação de DNA e outros fatores de epigenética. No plasma serão

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Página 06 de 14

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

quantificadas citocinas por ensaio multiplex, marcadores proteicos de inflamação além de eicosanoides, hormônios esteroides, endocanabinoides, compostos derivados de esfingolipídios/ ceramidas e metabólitos do metabolismo energético celular por espectrometria de massa. Os perfis de Nglicanas nas Fcs de IgGs serão avaliados e também será realizada a detecção de imunoglobulinas da IgM, IgG e IgA contra carboidratos com o uso de "Glycan Microarrays (NCFG v2)". Novas ferramentas biotecnológicas que permitam o estudo das relações entre o vírus, seus alvos celulares e anticorpos serão produzidas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Em todos os grupos serão incluídos indivíduos do sexo masculino ou feminino. Os participantes de G1 deverão ser indivíduos assintomáticos e saudáveis. Para G2, os critérios de inclusão envolverão diagnóstico molecular positivo para o vírus, sintomatologia ausente ou leve de COVID-19. Em G3 e G4 serão incluídos indivíduos doentes, com infecção de SARS-COV2 confirmada por diagnóstico molecular e COVID-19 estabelecida moderada ou grave, atendidos no Hospital São Paulo, Hospital Unimed ou Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto em Ribeirão Preto/SP. Em G5 serão incluídos indivíduos convalescentes, com diagnóstico molecular prévio de SARS-COV2 e ausência de sinais ou sintomas atuais da doença. Os participantes de G1, G2 e G5 deverão ter idade igual ou superior a 18 anos. Para os grupos G3 e G4 serão incluídos participantes acima de 12 anos.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Para os participantes de G2, G3, G4 e G5 o critério de exclusão será o resultado negativo para o diagnóstico molecular pelo SARS-COV-2. Para os participantes do grupo G1, o critério de exclusão será apenas gravidez. Essas informações serão obtidas do participante por auto-declaração no momento do convite para a pesquisa, obtidas nas respostas ao Questionário Geral proposto (em anexo).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Determinar, por meio da avaliação da resposta imunológica de pacientes infectados por SARS-COV2, potenciais biomarcadores para a evolução grave da COVID-19 e novos alvos terapêuticos.

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.176.358

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Investigar os perfis de N-glicanas de imunoglobulinas e citocinas pró ou anti-inflamatórias, nos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Caracterizar as imunoglobulinas plasmáticas e presentes na saliva, das classes IgM, IgG e IgA anti-carboidratos, para determinação da relação entre os padrões de anticorpos anti-carboidratos com o diagnóstico e prognóstico para as diferentes formas clínicas da doença.
- Avaliar perfil e expressão gênica de macrófagos alveolares obtidos de AFP de pacientes intubados, assim como avaliar perfis lipídicos e proteico do líquido surfactante pulmonar.
- Avaliar, por análise transcriptômica, a expressão gênica de receptores, fatores de transcrição, enzimas esteroideogênicas, enzimas do metabolismo de mediadores lipídicos, citocinas e outros mediadores relacionados à resposta imunológica dos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Determinar, por espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS), o perfil de produção de eicosanoides, hormônios esteroides, endocanabinoides, esfingolipídios/ceramidas e seus derivados metabólitos ativos, como também metabólitos do metabolismo energético celular em plasma de indivíduos infectados nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Associar os perfis de resposta imunológica e inflamatória determinados com os desfechos clínicos documentados da COVID-19.
- Sequenciar o exoma de indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, para identificação de polimorfismos genéticos que predispõem ao desenvolvimento da forma grave da doença e mudanças epigenéticas elencando fatores genéticos de baixo e alto risco à doença.
- Quantificar os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em diferentes condições clínicas de pacientes com Covid-19.
- Produzir ferramentas biotecnológicas que permitam o estudo das relações entre o vírus, seus alvos celulares e anticorpos.
- Analisar as experiências positivas e negativas de atendimento à Covid-19 nos serviços de saúde público do município de Ribeirão Preto-SP.
- Relacionar as variáveis sociodemográficas, clínicas, antropométricas, comportamentais e de risco com os parâmetros imunológicos, bioquímicos, genéticos e metabólicos analisados.

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

No momento das coletas de sangue pode haver riscos físicos como dor ou incômodo, formação de hematoma pós-colheita, que serão minimizados por uma escolha boa e criteriosa do local onde será retirado o sangue para que o paciente seja perfurado uma única vez. As amostras para pesquisa dos pacientes hospitalizados serão colhidas apenas quando se fizerem necessárias outras coletas para realização de exames laboratoriais de rotina, para acompanhamento do estado de saúde dos pacientes dos grupos mais graves, G3 e G4.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios diretos para os participantes do projeto; mas, futuramente, havendo confirmação das hipóteses deste trabalho e aceitação dos resultados, os pacientes poderão ser beneficiados durante o acompanhamento médico após o tratamento da doença. O estudo busca promover a análise de futuros marcadores que poderão auxiliar as condutas clínicas e terapêuticas para o tratamento da infecção e sequelas provocados pela COVID-19. Sabendo do potencial imunomodulador do sistema imunoenócrino, dos eicosanoides, de anticorpos e dos mediadores derivados de esfingosídeos/ceramidas na resposta imunológica, é plausível supor que o entendimento dessas interações possa ser utilizado como ferramenta futura para o desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença. Com a junção dos dados clínicos e laboratoriais, esperamos encontrar biomarcadores que possam diferenciar indivíduos saudáveis de assintomáticos portadores do vírus, assim como doentes sintomáticos hospitalizados não graves de doentes sintomáticos hospitalizados graves. Além disso, dentre os benefícios do estudo está a possibilidade identificarmos determinantes importantes da evolução da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 02:

A presente emenda altera os seguintes documentos:

1. PROJETO DETALHADO – “ProjCOVID_EMENDA2_versaolimpa.docx” postado na Plataforma Brasil em 16/07/2020.

Razão principal para alteração:

- Obtenção do aspirado de fluido pulmonar.

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – “TCLE_EMENDA2_versaolimpa.docx” postado na Plataforma Brasil em 16/07/2020.

Razão principal para alteração:

- Obtenção do aspirado de fluido pulmonar.

3. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO - “Cronograma_de_execEMENDA2_versaolimpa.docx” postado na Plataforma Brasil em 16/07/2020.

Alteração:

- 08.2020 a 31.12.2020: coleta dos aspirados de fluidos pulmonares.

4. INCLUSÃO DE PESQUISADOR NA EQUIPE

- Marcelo Dias Baruffi

5. INCLUSÃO DE CENTROS:

- UNIMED de Ribeirão Preto Cooperativa de Trabalho Médico

Pesquisadora Responsável: Karen Morejón.

LISTA ATUALIZADA DE CENTROS:

- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Centro coordenador).

Pesquisadora Responsável : Cristina Ribeiro de Barros Cardoso.

- UNIMED de Ribeirão Preto Cooperativa de Trabalho Médico.

Pesquisadora Responsável: Karen Morejón.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item “Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações”.

Recomendações:

Quanto ao Termo Consentimento Livre e Esclarecido referente ao arquivo “TCLE_EMENDA2_versaolimpa.docx” postado na Plataforma Brasil em 16/07/2020, na página 2 de 3, lê-se: “[...] também DOARÁ 20 ml de aspirado de fluido pulmonar, que é uma secreção que os médicos/enfermeiros retiram do pulmão de quem está intubado, para melhorar a respiração (essa secreção é retirada de rotina, independentemente da pesquisa e normalmente é descartada no

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

lixo.". (Destaque nosso). Solicita-se substituir o termo "doar" por "conceder" em todo o texto do TCLE, uma vez que o material biológico humano coletado no estudo continua pertencendo ao participante da pesquisa, permanecendo apenas sua guarda sob a responsabilidade institucional (Resolução CNS nº 441 de 2011, itens 9 e 9.I).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos nesta emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

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

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1584077_E2.pdf	23/07/2020 14:32:02		Aceito
Outros	Esclarecimento_pendencia_documental.docx	23/07/2020 14:19:54	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Outros	criacao_biorrepositorioEMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:39:16	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Outros	criacao_biorrepositorioEMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:38:26	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Outros	SolicitacaoemendaCONEP_justificativas.docx	16/07/2020 19:35:34	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execEMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:32:21	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_execEMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:31:45	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjCOVID_EMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:31:11	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjCOVID_EMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:30:36	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_EMENDA2_versestaques.docx	16/07/2020 19:30:00	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

Justificativa de Ausência	TCLE_EMENDA2_versaodestaques.docx	16/07/2020 19:30:00	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_EMENDA2_versaolimpa.docx	16/07/2020 19:27:09	Elisa Maria de Sousa Russo	Aceito
Outros	termoresponsabilidadeAngelina.pdf	26/06/2020 09:22:35	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	termoresponsabilidadeANAPAula.pdf	26/06/2020 09:22:16	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de concordância	AnuenciaUNIMED.pdf	26/06/2020 09:22:01	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaDraKarenUNIMED.pdf	26/06/2020 09:20:37	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AssentimentoCONEPlimpo.pdf	17/06/2020 14:23:54	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	CompendioFINALResubmis.pdf	08/06/2020 14:34:21	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Outros	Aprova_CAPP_final.pdf	05/06/2020 22:19:45	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Outros	Aprovacao_CAPP.pdf	02/06/2020 20:45:53	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaJonatanCarvalho.pdf	01/06/2020 18:47:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaVinicius.pdf	01/06/2020 18:05:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaVania.pdf	01/06/2020 18:01:30	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaNicola.pdf	01/06/2020 18:00:48	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaMarcelo.pdf	01/06/2020 18:00:31	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencialilian.pdf	01/06/2020 18:00:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaKAMILA.pdf	01/06/2020 17:59:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuentialsabelle.pdf	01/06/2020 17:52:20	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciaGilberto.docx	01/06/2020 17:52:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaFabiani.doc	01/06/2020 17:51:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaElisa.pdf	01/06/2020 17:51:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de	AnuenciaCassia.pdf	01/06/2020	Cristina Ribeiro de	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

Pesquisadores	AnuenciaCassia.pdf	17:48:23	Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAugusto.pdf	01/06/2020 17:48:03	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAngelina.pdf	01/06/2020 17:47:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaPaulaMoraisFernandes.pdf	01/06/2020 17:47:32	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaThais.pdf	01/06/2020 17:47:16	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaNayore.docx	01/06/2020 17:47:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaLuanaUfscar.docx	01/06/2020 17:46:46	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIAJamilie.docx	01/06/2020 17:46:29	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuencialNgyrdCarmona.pdf	01/06/2020 17:46:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaGiovanna.pdf	01/06/2020 17:45:54	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaCaroline.pdf	01/06/2020 17:44:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaANGELO.pdf	01/06/2020 17:42:40	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaFlavia.pdf	01/06/2020 17:40:56	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaCarolinaXavier.pdf	01/06/2020 17:40:31	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaSandra.docx	01/06/2020 17:40:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	CompendioFINAL.docx	01/06/2020 17:39:37	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoNOVAassinada.pdf	01/06/2020 17:30:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaSANTACASA.pdf	01/06/2020 17:29:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	Questionario_online_Chamada_Publica.pdf	01/06/2020 17:19:29	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	QuestionarioG3G4.pdf	01/06/2020 17:17:07	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	QuestionarioG1G2G5.pdf	01/06/2020 17:02:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Hospital.pdf	05/04/2020 17:32:02	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e	Infraestrutura.pdf	05/04/2020 17:27:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.176.358

Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	05/04/2020 17:27:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CamillaN.pdf	05/04/2020 17:23:01	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuenciabel.pdf	05/04/2020 17:08:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Omar_equipe.pdf	05/04/2020 17:05:00	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Fernando.pdf	05/04/2020 17:04:33	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Pedro.pdf	05/04/2020 17:04:08	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Lucia.pdf	05/04/2020 17:03:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Cristina.pdf	05/04/2020 17:03:42	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Carlos.pdf	05/04/2020 17:03:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Camila.pdf	05/04/2020 16:59:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 28 de Julho de 2020

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

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br