Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Bioquímica e Imunologia Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

Resistência ao SARS-CoV-2 induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*

Rafaela Lúcia Lopes de Souza

Ribeirão Preto 2023

Rafaela Lúcia Lopes de Souza

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Resistência ao SARS-CoV-2 induzida por Paracoccidioides brasiliensis

Dissertação apresentada ao programa de Pósgraduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: João Santana da Silva Coorientadora: Luciana Benevides

Ribeirão Preto 2023 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Souza, Rafaela Lúcia Lopes de Resistência ao SARS-CoV-2 induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*. Ribeirão Preto, 2023. 78 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Imunologia básica e aplicada. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Silva, João Santana

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. SARS-CoV-2. 3. Coinfecção.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Plataforma Bi-institucional de Medicina Translacional Fiocruz São Paulo – SP e no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo, com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) - (Programa 9951- CAPES-EPIDEMIAS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - (Processos 2020/05527-0 e 2013/08216-2).

Nome: Rafaela Lúcia Lopes de Souza

Título: Resistência ao SARS-CoV-2 induzida por Paracoccidioides brasiliensis

Dissertação apresentada ao Programa de pósgraduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. João Santana da Silva. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Plataforma Bi-institucional de Medicina Translacional – Fundação Oswaldo Cruz:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Eurico Arruda Neto. Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo:

Julgamento: ______ Assinatura: _____

Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca. Universidade de Brasília:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais Reinaldo e Ana, que sempre me apoiaram e nunca me deixaram desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Me ensinaram a acreditar em mim e a ter coragem para realizar novos projetos, de me empenhar para alcançar meus objetivos, e acima de tudo, por sempre serem o meu porto seguro. Tudo o que alcancei devo a vocês.

Amo vocês demais!

Agradecimentos

Aos meus pais, Reinaldo e Ana, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando os meus estudos. Pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim e por serem sempre o meu porto seguro.

Ao meu irmão, Reinaldo Filho, a quem sempre pude contar nos momentos de turbulência, sendo sempre o meu alívio de estresse com nossos momentos descontraídos e sempre me apontando seu ponto de vista que me faz observar vários ângulos diferentes de uma mesma situação.

Ao meu companheiro, Daniel Pablo, meu melhor amigo e confidente, que nunca me deixou enfraquecer e sempre me apoiou de diversas formas durante todo esse tempo juntos.

Ao Professor João Santana, pelos seus ensinamentos, conselhos e confiança. Agradeço demais por me receber em seu laboratório e me fazer crescer e pensar como cientista. Agradeço também a sua esposa Ângela, por todo o carinho e acolhimento que demonstra a todos os alunos do laboratório.

Agradeço especialmente a Luciana Benevides pelos seus ensinamentos, paciência e sua incrível dedicação ao me coorientar durante o meu mestrado. Tenha certeza que todos os seus ensinamentos vou levar para o resto da minha vida.

A Ana Cristine que se tornou um porto seguro em Ribeirão preto, e sempre me escutou, auxiliou e aconselhou com muito carinho.

A Manuela Sales por ter me acolhido em seu laboratório como aluna de iniciação científica. Com paciência e carinho você iniciou a minha jornada pela imunologia e me levou até o mestrado. Você mudou o rumo da minha vida!

Ao grupo SARS-CoV-2, Thaís Rigoni, Osvaldo Campos, Rodrigo Abuná, Bruna Rattis e Mariela Piccin pelos conhecimentos compartilhados, pelas as parcerias e espírito de equipe. Devo muito da minha evolução científica a todos vocês.

Aos amigos e colegas do laboratório Lívia Mendes, Maria Cláudia, Rodrigo Moreli, Isabel Guerra, Francielle Piotto, Fernanda Mesquita, Nathália Leite, Amanda Freire, Andressa Barban, Madson Rodrigues, Poliana Tosta, Gabriel Barretto, Laura Daniel, Giovanna Silva, Stella Francy, Hellen Anastacia, Itaciara Seixas, Kely Catarine e Warrison Andrade, vocês contribuiram demais para a minha formação pessoal e profissional.

A Fundação Oswaldo Cruz, FAPESP, CAPES e CNPQ pela ajuda financeira.

Muito Obrigada!

"Na vida, quando você vem andando com uma vela acesa e você encontra outra pessoa com a vela apagada nas mãos, e então você cede a chama da sua vela, ambos ficam mais iluminados".

Gilberto Gimenstein

Resumo

Souza, RLL. Resistência ao SARS-CoV-2 induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2023. 78 fls.

Fungos primários, que são fungos capazes de iniciar uma infecção em um hospedeiro imunocompetente, em contrapartida, existem os fungos oportunistas, que se desenvolvem principalmente em hospedeiros imunocomprometidos, ambos os patógenos são um grande problema de saúde pública e tais infecções cursam com altas taxas de mortalidade e morbidade, o que as tornam grande prioridade em pesquisas médicas. No presente trabalho, verificamos a coinfecção pelo fungo Paracoccidioides brasiliensis da cepa 18 (Pb18) e o vírus que causa a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Para tanto, comparamos grupos infectados apenas com cada um dos patógenos e grupos coinfectados. Tais animais foram infectados ou não com 1x10⁶ leveduras do fungo Pb18 e, em seguida, infectados ou não com 5x10⁴ PFU do vírus SARS-CoV-2. Nossos resultados demonstraram que camundongos coinfectados apresentam uma menor perda de peso e mortalidade, quando comparados com os camundongos infectados apenas com o vírus, bem como uma menor carga viral pulmonar, assim como menor infiltrado inflamatório, demonstrando que a prévia infecção com o fungo Pb18 resulta em resistência contra o vírus SARS-CoV-2. Além disso, ensaios de citometria de fluxo realizados no sexto dia após a infecção pelo SARS-CoV-2 demonstraram uma menor freguência de monócitos inflamatórios no tecido pulmonar de camundongos previamente infectados com Pb18 guando comparado aos camundongos infectados apenas com SARS-CoV-2. Observamos também que camundongos infectados apenas com SARS-CoV-2 apresentaram maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e menor frequência de células dendríticas, macrófagos alveolares e de linfócitos do tipo T no tecido pulmonar, quando comparado aos camundongos coinfectados e infectados apenas com o fungo. Essa resistência é dependente da via de sinalização de interferon tipo 1, visto que, ao bloquear essa via, a sobrevida dos animais bem como o controle da carga viral foram prejudicados. Este estudo poderá nos ajudar a entender como a infecção pelo fungo impacta a subsequente infecção pelo SARS-CoV-2, e assim nos apontar novos alvos terapêuticos contra a doença COVID-19.

Palavras chaves: Paracoccidioides brasiliensis, SARS-CoV-2, Coinfecção.

Abstract

Souza, RLL. Resistance to SARS-CoV-2 induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. Masters disseration. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2023. 78 fls.

Primary fungi are fungi that are able to initiate an infection in an immunocompetent host, whereas there are opportunistic fungi, which develop mainly in immunocompromised hosts, both pathogens are a major public health problem, such infections carry high mortality and morbidity rates, making them a high priority in medical research. In the present work, we verified the coinfection by the fungus Paracoccidioides brasiliensis of strain 18 (Pb18) and the virus that causes severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2). To do so, we compared groups infected only with each of the pathogens and with coinfected groups. Such animals were infected or not with 1x10⁶ yeasts of the Pb18 fungus and then infected or not with 5x10⁴ PFU of the SARS-CoV-2 virus. Our results showed that coinfected mice have a lower weight loss and mortality when compared to mice infected with the virus alone, as well as a lower pulmonary viral load, as well as a lower inflammatory infiltrate, suggesting a protective activity of the Pb18 fungus against the SARS-CoV-2 virus. In addition, flow cytometry assays performed on the sixth day after SARS-CoV-2 infection demonstrated a lower frequency of inflammatory monocytes in the lung tissue of mice previously infected with Pb18 when compared to mice infected with SARS-CoV-2 alone. In contrast, mice infected only with SARS-CoV-2 showed lower expression of proinflammatory cytokines and lower frequency of dendritic cells, alveolar macrophage and T-type lymphocytes, when compared to coinfected mice and Pb18-infected mice. This resistance depends on the type 1 interferon signaling pathway, since, by blocking this pathway, the survival of the animals as well as the control of viral load were restricted. This study can help us understand how the fungus infection impacts the subsequent SARS-CoV-2 infection, and thus point us to new therapeutic targets against the COVID-19 disease.

Keywords: Paracoccidioides brasiliensis, SARS-CoV-2, Coinfection.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Paracoccidioidomicose	17
1.2. SARS-CoV-2	21
1.3. Coinfecções	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	31
3.2 Viabilidade das leveduras	31
3.3 Produção viral (SARS-CoV-2)	31
3.4 Titulação viral	32
3.5 Animais experimentais	32
3.6 Modelo experimental de coinfecção: Pb18 e SARS-CoV-2 e trata	mento com
anticorpo contra o receptor de interferon do tipo 1	33
3.7 Análise histopatológica	33
3.8 Extração de RNA Total	34
3.9 Reação de PCR para Quantificação da carga viral de SARS-CoV	′-234
3.10 Síntese de cDNA	35
3.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	35
3.12 Dosagem de citocinas por Elisa	
3.13 Isolamento de leucócitos do pulmão	37
3.14 Citometria de Fluxo	37
3.15 Análise estatística	
4. RESULTADOS	39
4.1 A infecção crônica com P. brasiliensis induz resistência à infecçã	o por SARS-
CoV-2	40
4.2 Camundongos coinfectados apresentam menor carga viral em di	ferentes
órgãos e em diferentes estágios da infecção por SARS-CoV-2	42
4.3 Caracterização de células mieloides para o tecido pulmonar de a	nimais
coinfectados Pb18 e SARS-CoV-2	44

	4.4 Caracterização de linfócitos T no tecido pulmonar de animais infectados com	I
	Pb18 e SARS-CoV-2	49
	4.5 A infecção prévia com o fungo P. brasiliensis reduz a produção de citocinas	
	pró-inflamatórias durante a infecção por SARS-CoV-2	52
	4.6 Interferon do tipo 1 é necessário para a resistência dos camundongos	
	coinfectados	54
5	. DISCUSSÃO	58
6	. CONCLUSÕES	65
7	. REFERÊNCIAS	67
8	. ANEXOS	76
	Anexo 1: Sequência de primers	77
	Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal	78

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura de uma parece celular fúngica18
Figura 2. Fotomicrografia de tecido pulmonar de camundongo aos 90 dias após à
infecção por <i>P. brasiliensis</i> 20
Figura 3. Estrutura do coronavírus22
Figura 4. Camundongos k18hACE2 infectados com Pb18 são resistentes à infecção
com SARS-CoV-240
Figura 5. Camundongos k18hACE2 infectados com Pb18 apresentam menor
infiltrado inflamatório pulmonar frente à infecção com SARS-CoV-242
Figura 6. Carga viral em diferentes tecidos de animais coinfectados ou não com
Pb18 e SARS-CoV-243
Figura 7. Quantificação de células mieloides no tecido pulmonar de animais
coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-245
Figura 8. Quantificação de macrófagos alveolares no tecido pulmonar de animais
coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-246
Figura 9. Quantificação de células dendríticas plasmocitóides no tecido pulmonar de
animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-247
Figura 10. Quantificação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs)
no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2.
Figura 11. Quantificação de monócitos inflamatórios no tecido pulmonar de animais
coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-249
Figura 12. Quantificação de linfócitos T no tecido pulmonar de animais coinfectados
ou não com Pb18 e SARS-CoV-250
Figura 13. Quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ no tecido pulmonar de
animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-251
Figura 14. Expressão das moléculas CD44 e PD-1 em linfócitos T no tecido
pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-252
Figura 15. Expressão gênica de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de
animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-254
Figura 16. A proteção mediada pela infecção por Pb18 contra SARS-CoV-2 é
dependente da via de sinalização de IFN tipo 155

Figura 17. O bloqueio da sinalização da via de interferon do tipo 1 aumenta a	
replicação viral de SARS-CoV-2.	56

Lista de abreviaturas

- Pb18 Paracoccidioides brasiliensis da cepa 18
- SARS-CoV-2 Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
- PCM Paracoccidioidomicose
- PAMPs Padrões moleculares associados ao patógeno
- PRRs Receptores de reconhecimento de padrões
- TLRs Receptores do tipo TOLL
- CLRs Receptores de lectina do tipo C
- ICAM3 Molécula de adesão intracelular 3
- Mincle Receptor de lectina do tipo C que é expresso principalmente em Macrófagos
- NLRs Receptores intracelulares do tipo NOD
- NF-kB Fator nuclear kappa B
- MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno
- SYK Tirosina quinase do baço
- IRF Fator regulatório de Interferon
- $TNF-\alpha$ Fator de necrose tumoral alfa
- IFN-γ Interferon gama
- DCs Células dendríticas
- ACE2 Enzima conversora de angiotensina 2
- ASGR1 Receptor-1 da asialoglicoproteína
- TMPRSS2 Serina protease transmembrana 2
- MDA5 Diferenciação de melanoma 5
- IRF3 Fator regulatório de Interferon 3
- IFN Interferon
- DAMPs Padrões moleculares associados ao dano

- IFN-1 Interferon do tipo 1
- cDCs Células dendríticas convencionais
- Mo-DCs Células dendríticas derivadas de monócitos
- pDCs Células dendríticas plasmocitóides
- MAs Macrófagos alveolares
- IFNAR Receptor de interferon 1 e 2
- GRP78 Proteína regulada por glicose
- CotH3 Homólogos de proteína de esporo 3

k18-hACE2 – Camundongos transgênicos que receberam o gene humano para o receptor ECA2

- H&E Hematoxilina e eosina
- CFU Unidades Formadoras de Colônia
- PFU Unidades Formadoras de Placa
- NI Camundongos não infectados

1. INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica causada pelo fungo dimórfico do gênero Paracoccidioides, que é endêmico nas Américas, encontrado principalmente entre o México até a Argentina, porém possui alta incidência no Brasil, Venezuela e Colômbia (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEÓN; PONCE-DE-LEÓN, 2012). A PCM é a micose sistêmica mais frequente nessas regiões, sendo reconhecida pela primeira vez pelo médico e cientista brasileiro Adolfo Lutz em 1908, quando isolou e caracterizou o fungo em lesões de pacientes (DE ABREU E SILVA et al., 2013), posteriormente, Floriano Paulo de Almeida nomeou este fungo de *Paracoccidioides brasiliensis* (CANTEROS, 2018). A PCM não é uma doença de notificação compulsória, sendo que a prevalência, incidência e morbidade da micose baseia-se em relatos de inquéritos epidemiológicos, séries de casos e dados de hospitalização e mortalidade (MARTINEZ, 2017). No Brasil essa doença é considerada a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias, com taxa de mortalidade maior que a de leishmanioses, e a mais alta entre as micoses sistêmicas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Na natureza, o fungo *Paracoccidioides* se desenvolve na forma micelial e produz os propágulos infectantes chamados conídios que, quando inalados, se convertem na forma de levedura do fungo, constituindo a forma parasitária nos tecidos do hospedeiro (LACAZ, 2002). Nesse contexto, o estabelecimento da doença, a sua disseminação e a gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como virulência, composição antigênica, além de condições ambientais e, principalmente, dos fatores ligados ao hospedeiro que podem induzir ou não o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz (PARISE FORTES et al., 2011).

Os fungos possuem uma parede celular composta por carboidratos, que conferem sua forma e proteção, podendo sua estrutura variar dependendo da espécie fúngica e do ambiente em que o fungo se encontra, dentre os principais componentes da parede celular fúngica com importância médica estão inclusos a manana, β-glucana e quitina (Figura 1), estas estruturas caracterizem-se como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) contidos nas células do sistema imune do hospedeiro, sendo os mais importantes os receptors de tipo TOLL (TLRs); Receptores de lectina do tipo C (CLRs; como dectina-1, dectina-2, molécula de adesão intracelular 3 (ICAM3), *Mincle* (receptor de lectina do tipo C que é expresso principalmente em

Macrófagos), receptor de manose e galectinas (como a galectina 3) (BONFIM; MAMONI; LIMA BLOTTA, 2009; BROWN; GORDON; WILLIAM, 2003), assim como receptores intracelulares do tipo NOD (NLRs). Dentre esta última classe de receptores, destaca-se o receptor intracelular NLRP3, pois foi amplamente estudado durante infecções experimentais com *P. brasiliensis* (KETELUT-CARNEIRO et al., 2015). Seu estímulo leva à ativação da caspase-1 a qual induz a maturação de IL-1β e IL-18, e levam a célula à morte celular por piropitose. Este mecanismo está relacionado à resistência à infecção por *P. brasiliensis*, enquanto a ativação do receptor intracelular NLRC4, leva a suscetibilidade a PCM (SOUZA et al., 2021). Quando ativados, os PRRs induzem as células do hospedeiro a produzirem citocinas e quimiocinas por meio da sinalização intracelular via fator nuclear kappa B (NF-KB), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), tirosina quinase do baço (Syk) e Fator regulatório de Interferon (IRF) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).



Figura 1. Estrutura de uma parece celular fúngica. Micrografia eletrônica da parede celular do fungo *Candida albicans*, contendo camadas ricas em carboidratos, com destaque para a manana, o β-glucano e a quitina. Ressaltando os principais receptores contido nas células do hospedeiro que reconhecem essas estruturas. **Fonte:** Retirado e adaptado de Nature Reviews (HARDISON; BROWN, 2012)

Fagócitos, como os neutrófilos e macrófagos, são as primeiras células a detectarem os antígenos fúngicos e apresentam importante papel na atividade fungicida através dos mecanismos dependentes dos metabólitos de oxigênio como H_2O_2 e ânion superóxido. Nesse sentido, esses tipos celulares controlam a infecção e contribuem para o desenvolvimento de resposta imune específica contra o *P. brasiliensis*. Para tal, a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-12 por fagócitos conduz a uma resposta celular específica contra o fungo do tipo Th1, com produção de interferon gama (IFN- γ) que, por sua vez, desencadeia a expressão de quimiocinas como CCL2, CCL5 e CXCL10, as quais favorecem a migração de leucócitos para o pulmão. Além disso, a cooperação entre essas citocinas é essencial

para a eficiente atividade fungicida evitando a disseminação do fungo e, mais adiante, controlando a infecção (MARTINEZ, 2015; PARISE FORTES et al., 2011; SOUTO et al., 2003). Portanto, a falha das células T em fornecer sinais ativadores aos fagócitos pode predispor o indivíduo a infecções, limitar a eficácia terapêutica de agentes antifúngicos e favorecer a persistência da infecção fúngica (ROMANI, 2004). Aliado a isso, os fungos desenvolveram mecanismos para evadir a resposta imune, permitindo assim a sua sobrevivência e proliferação nos tecidos do hospedeiro (CAVASSANI et al., 2011). Estudos em pacientes com diferentes gravidades da PCM mostram uma associação entre a reatividade celular do tipo Th1 com produção de IL-2, IL-12, IL-18, TNF-α e IFN-γ e as formas assintomáticas e leves da infecção, enquanto respostas celulares do tipo Th2 com a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 são associadas a doenças graves e recidiva da doença (PARISE FORTES et al., 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018).

Adicionalmente, o meio hormonal do hospedeiro pode ter influência sobre diversas infecções e, de variadas formas, pode afetar sua patogenicidade (ADACHI et al., 2022; DEMIREL; GUIMARAES; DEMIREL, 2022; KURAKADO; KUROGANE; SUGITA, 2017; STEVENS, 1989). De maneira interessante, mesmo quando a infecção com alguns fungos ocorre em proporções semelhantes, as mulheres são protegidas pela ação inibitória do estradiol, que inibe a transformação da forma micelial para forma leveduriforme do fungo (MARTINEZ, 2015). Em experimentos com camundongos machos, a resposta imune a reação inflamatória crônica tem predominância de linfócitos e macrófagos, com formação de granuloma aparente contendo leveduras; em contraste, uma reação inflamatória crônica foi escassa em fêmeas, com poucos granulomas, e raras leveduras foram observadas (SHANKAR et al., 2011). Embora as respostas celulares do tipo Th1 sejam centrais para a proteção contra fungos, as células Th17 também apresentam funções importantes na resposta do hospedeiro contra patógenos fúngicos (DE OLIVEIRA et al., 2008; GROSS et al., 2006; ZHANG et al., 2009), ao produzirem IL-17, essas células mantêm a imunidade da mucosa através da indução de citocinas como IL-6 e da produção das quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL8 que, por sua vez, atraem neutrófilos para o local da infecção os quais auxiliam no controle do fungo nos estágios iniciais da infecção (HERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2013; MONIN et al., 2015; PUERTA-ARIAS; MEJÍA; GONZÁLEZ, 2020; TRISTÃO et al., 2017), em

contrapartida, os neutrófilos também podem aumentar a natureza inflamatória da resposta imune granulomatosa (FLYNN; CHAN; LIN, 2011) (Figura 2).



Figura 2. Fotomicrografia de tecido pulmonar de camundongo aos 90 dias após à infecção por *P. brasiliensis*. Fonte: Souza, RLL.

A doença granulomatosa crônica é uma imunodeficiência primária induzida por infecções persistentes que podem ocorrer em vários tecidos do hospedeiro, como na pele, nas vias aéreas e no fígado (ROOS, 2016), é caracterizada pelo acúmulo focal de macrófagos ativados que, geralmente, desenvolvem uma aparência semelhante a um epitélio (ROBBINS; KUMAR, 2012). Após o encontro do patógeno com os macrófagos presentes nas vias aéreas, estes podem facilitar a propagação da doença, disseminando o agente invasor e permitindo sua migração para locais distais nos pulmões (FLYNN; CHAN; LIN, 2011; PARISE FORTES et al., 2011). Os macrófagos infectados, então, recrutam macrófagos não infectados com o intuito de conter o agente agressor (FLYNN; CHAN; LIN, 2011), concomitante a isso, células dendríticas (DC's) pulmonares e as que estão presentes nas vias aéreas migram para os linfonodos, onde uma resposta de células T é preparada (WOLF et al., 2007). A inflamação pulmonar devido à interação dessas células leva ao recrutamento de monócitos, neutrófilos e células T para os pulmões (FLYNN; CHAN; LIN, 2011).

As células T orquestram o equilíbrio inflamatório no local da infecção, isso inclui células T CD8 citotóxicas e células T CD4 produtoras de IL-2 e IFN-γ aliado a macrófagos/monócitos, as principais células produtoras de TNF- α (MATTILA et al., 2011; RICHES; CHAN; WINSTON, 1996), essa citocina atua sobre a função macrofágica amplificando a resposta imune com o aumento da atividade fungicida dessas células e em concomitância levando à lesão tecidual através da produção exacerbada de metabólitos intermediários do oxigênio, colagenases e ativação das moléculas de adesão e proliferação fibroblástica (PARISE FORTES et al., 2011). A persistência do fungo leva a forma crônica da PCM apresentando a resposta imune intermediária entre o padrão de resposta T CD4 do tipo Th1 para o tipo Th2, produtor de IL-4, IL-5 e TGF- β com o intuito da reparação do tecido lesado (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018; RAMAKRISHNAN, 2012). Durante a reparação dos tecidos, o tecido conjuntivo é estabelecido, e se excessivo, é patológico e chamado fibrose, que é resultante de inflamação desregulada e pode levar à falência fatal dos órgãos (PAGÁN; RAMAKRISHNAN, 2018).

1.2. SARS-CoV-2

O primeiro registro de coronavírus infectando a espécie humana foi feito por Tyrrel e Bynoe em 1965, onde os pesquisadores isolaram o HCoV-B814 de uma criança com quadro de resfriado (A Z KAPIKIAN, 1975). Mais adiante, em 2019, um conjunto de casos de pneumonia em Wuhan, China, foi causado por um novo betacoronavírus, o SARS-CoV-2, que surgiu como um novo patógeno causando uma pandemia de gripe COVID-19 (HUANG et al., 2020). Embora único em sua transmissão e virulência, a COVID-19 é semelhante às doenças zoonóticas, como suas variantes SARS-CoV e MERS-CoV, em apresentar sintomas graves semelhantes à gripe e problemas respiratórios agudos (SALIAN et al., 2021). O SARS-CoV-2 é um vírus que tem como material genético o RNA de sentido positivo, sendo coronavírus composto proteínas virion pelas estruturais denominadas 0 Nucleocapsídeo (N), Membrana (M), Envelope (E) e Spike (S) (Figura 3).



Figura 3. Estrutura do coronavírus. Apresentação de quatro proteínas virais de SARS-CoV-2: a proteína spike (S), do envelope (E), da membrana (M) e as nucleocapsídeo (N) Fonte: Retirado e adaptado de - Nature Revisa Biologia Celular Molecular (JACKSON et al., 2022)

Este vírus utiliza como porta de entrada nas células do hospedeiro principalmente a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (SHANG et al., 2020; ZHOU et al., 2020a), a qual a sua expressão no pulmão inferior é relativamente limitada às células alveolares do tipo II, sendo maior no epitélio brônquico superior e muito maior no epitélio nasal, principalmente nas células ciliadas (AHN et al., 2021; LEE et al., 2020; YE et al., 2004). O papel fisiológico primário da ACE2 está envolvido na regulação da vasoconstrição e da pressão arterial (LAN et al., 2020). Além da ACE-2, vários receptores como o receptor-1 da asialoglicoproteína (ASGR1), KREMEN1 e Transferrina (GU et al., 2000; TANG et al., [s.d.]), bem como receptores imunológicos como CD209 e o de lectina do tipo C de domínio 4, ligam-se a inúmeros vírus, incluindo SARS-CoV e SARS-CoV-2, facilitando a disseminação viral (GAO et al., 2020).

O SARS-CoV-2 também utiliza proteases, como a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) (BAGGEN et al., 2021), as quais são responsáveis por clivar poliproteínas virais, como, por exemplo, a proteína S, durante o processo de replicação viral (IWATA-YOSHIKAWA et al., 2019). O SARS-CoV-2 utiliza principalmente as proteínas ACE2 e TMPRSS2 para entrar nas células hospedeiras, após a entrada do vírus na célula, as células da resposta imune inata infectadas com o vírus, reconhecem o agente invasor por meio de sensores de RNA citosólico e endossomal, incluindo RIG-I, TLRs (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) e a proteína associada à diferenciação de melanoma 5 (MDA5) (DOSCH; MAHAJAN; COLLINS,

2009; TOTURA et al., 2015). O reconhecimento viral por TLR, juntamente com outras respostas celulares à infecção viral, como a formação de espécies reativas de oxigênio e a liberação de padrões associados ao dano (DAMPs), contribuem para a ativação do inflamassoma NLRP3 (KELLEY et al., 2019; NIETO-TORRES et al., 2015). Esse inflamassoma ativa a protease caspase-1 que induz a morte celular por piropitose ao clivar a proteína Gasdermina D (HE et al., 2015), e também induz a conversão de pró-interleucina-1β e pró-interleucina-IL-18 nas suas formas biologicamente ativas, IL-18 e IL-18 respectivamente (KELLEY et al., 2019). A IL-18 induz uma resposta celular endotelial que facilita a infiltração de células imunes em tecidos infectados ou danificados (DINARELLO, 2009). Já a IL-18 é uma citocina que, juntamente com a IL-12, age como um fator indutor de IFN-γ que, por sua vez, é uma importante citocina do perfil de células T CD4 do tipo Th1 (DINARELLO, 1999). A extensão da ativação do NLRP3 se correlaciona com a gravidade da doença COVID-19 (RODRIGUES et al., 2020). Além disso, o reconhecimento do RNA viral pode resultar na ativação de genes estimulados por interferon, induzindo assim a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, além de interferon do tipo 1 (IFN-1) (BRODIN, 2021). O vírus SARS-CoV-2 apresenta a capacidade de inibir ou de retardar a indução do IFN-1 em células infectadas (ARUNACHALAM et al., [s.d.]), fazendo com que o vírus se replique sem controle, enquanto as células do sistema imune infectadas apresentem uma resposta pró-inflamatória aberrante, com consequente dano aos tecidos do hospedeiro (BRODIN, 2021).

As respostas imunes a agentes infecciosos são iniciadas e controladas por várias populações de células apresentadoras de antígenos, incluindo as DCs convencionais (cDCs), DCs derivadas de monócitos (Mo-DCs), DCs plasmocitóides (pDCs) e macrófagos alveolares (MAs). Os macrófagos alveolares são as células imunes inatas mais abundantes no pulmão distal, localizados na superfície luminal do espaço alveolar. Estas são provavelmente as primeiras células a encontrar o SARS-CoV-2 durante a infecção e ajudam a iniciar, orquestrar e amenizar a resposta imune no pulmão (DALSKOV et al., 2020). Semelhante a outros macrófagos residentes dos tecidos, os macrófagos alveolares também realizam funções não imunes, específicas do tecido pulmonar e homeostáticas, mais notavelmente, a liberação de surfactantes (JOSHI; WALTER; MISHARIN, 2018). Após a exposição do trato respiratório a diversos estímulos externos, os MAs apresentam atividade anti-inflamatória dentro dos espaços alveolares após a fagocitose de partículas apoptóticas oriundas de

células epiteliais pulmonares que foram infectadas com SARS-CoV-2 (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). Estudos demonstraram que a eferocitose realizada por esse tipo celular impede que as células mortas iniciem respostas próinflamatórias nos alvéolos (GRABIEC; HUSSELL, 2016; KIM et al., 2018). Assim como os MAs, as DCs também podem controlar o grau de respostas inflamatórias durantes as infecções e, dessa forma, contribuir significativamente para o controle da gravidade da doença (LIN et al., 2008). Dentre as subpopulações de DCs, as pDCs são um tipo único de célula sentinela que pode detectar ácidos nucleicos derivados de patógenos e responder com produção rápida e massiva de IFN-1, principalmente na fase aguda da infecção (REIZIS, 2019a; WEBSTER; ASSIL; DREUX, 2016). A capacidade de produção de IFN-1 por pDCs depende de fatores de transcrição da família dos fatores reguladores de interferon (IRF), incluindo IRF7 e IRF8 (HONDA et al., 2005; SICHIEN et al., 2016). Os IFN-1 são conhecidos fatores protetores fundamentais na prevenção da gravidade da doença COVID-19, diante disso, análises genéticas de pacientes com COVID-19 grave relataram doenças caracterizadas pela deficiência na produção de IFN-1 e outros genes codificadores de sensores de RNA e reguladores de interferon (ZHANG et al., 2020). Adicionalmente, foi descrita a diminuição da guantidade de DCs durante essa doença (CAMPANA et al., 2020; SANCHEZ-CERRILLO, [s.d.]). Outra singularidade durante a infecção pelo SARS-CoV-2 decorre das DCs infectadas não migrarem para os linfonodos para realizar apresentação direta de antígenos e assim ativar células T (LAW et al., 2005), evidenciando a deficiência induzida ao hospedeiro pelos virus da família Coronaviridae no que tange a apresentação de antígeno e combate viral.

A resposta mediada por linfócitos T contra o SARS-CoV-2 tem grande impacto no resultado clínico dos pacientes. As primeiras autópsias de pacientes com COVID-19 mostraram o acúmulo de células mononucleares no pulmão, juntamente com baixos níveis de linfócitos T ativos no sangue periférico (XU et al., 2020). Segundo dados de Chan Qin et al., a contagem média de células T foi menor em pacientes com COVID-19 quando comparado a pacientes infectados por outros vírus (QIN et al., [s.d.]). Dessa forma, o SARS-CoV-2 possui mecanismos de escape imunológico viral que deixam o indivíduo debilitado e suscetível a outras infecções oportunistas, principalmente em indivíduos que desenvolvem a COVID-19 na forma grave.

1.3. Coinfecções

Um dos sintomas graves provocados pela COVID-19 é a síndrome do desconforto respiratório agudo, sendo a ventilação mecânica um tratamento de suporte necessário nesses casos. No entanto, essa abordagem terapêutica pode predispor o paciente à pneumonia, com impacto no tempo de internação e nas taxas de mortalidade. Assim, uma infecção prévia com o SARS-CoV-2 pode deixar o paciente vulnerável às infecções oportunistas, principalmente em ambientes hospitalares (AL-TAWFIQ et al., 2021; FATTORINI et al., 2020; MOSER et al., 2021).

Entre infecções virais que causam doenças respiratórias, é comum a coinfecção com outros vírus respiratórios. Em diferentes países, estudos clínicos relataram casos de coinfecção viral entre SARS-CoV-2 e os vírus sincial respiratório, rinovírus, metapneumovírus humano, parainfluenza tipo 2 ou coronavírus humano HKU1 (LIN et al., 2020). Além disso, a coinfecção entre SARS-CoV-2 e bactérias ou fungos também se tornaram comuns durante esse tipo de pneumonia viral, especialmente em pacientes com a forma grave da COVID-19, sendo que os bacilos negativos, os fungos do gênero *Candida, Aspergillus* e da ordem *Mucorales* os tipos mais comuns (AL-TAWFIQ et al., 2021; ARASTEHFAR et al., 2020; GU et al., 2020; LAI; YU, 2021).

Na maioria dos indivíduos, a infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta-se na forma leve ou moderada, no entanto, ao adquirir uma nova infecção no decorrer da doença COVID-19 o sistema imunológico do indivíduo é sobrecarregado, o que geralmente leva a uma piora no quadro do paciente (NETEA et al., 2020). De maneira geral, pacientes que foram positivos para SARS-CoV-2 e outros patógenos, o tratamento foi mais longo e complexo (TAY et al., 2020), ocorrendo uma piora significativa no quadro geral da doença e maior dano aos tecidos do hospedeiro (BAI et al., 2021).

O SARS-CoV-2 infecta primeiramente as células epiteliais alveolares ligandose ao receptor ACE2 com o auxílio do TMPRSS2, assim o vírus reprime as respostas mediadas por IFN-1 bloqueando a transcrição de genes estimulados pelo IFN e variantes genéticas pré-existentes. Além disso, autoanticorpos, que são anticorpos que atuam contra proteínas do próprio indivíduo que o produziu, contra o IFN-1, impedem a sinalização através do complexo receptor de interferon 1 e 2 (IFNAR) (LARIONOVA et al., 2022). Aditivamente, a liberação excessiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias levam ao recrutamento de macrófagos derivados de monócitos e neutrófilos para os pulmões, o que contribuem ainda mais para hiperinflamação. Esta desregulação geral da resposta imune favorece o desenvolvimento de coinfecções, em especial infecções fúngicas oportunistas (HOENIGL et al., 2022).

Durante a COVID-19, a lise celular induzida pelo vírus favorece a invasão dos tecidos por fungos, de modo que a liberação de DAMPs por células mortas ou danificadas potencializa ainda mais o fenótipo hiperinflamatório (TAY et al., 2020). Somado a isso, condições ligadas ao hospedeiro como hiperglicemia (MARFELLA et al., 2022), uso excessivo de esteroides e altos níveis de corpos cetônicos e de ferro regulam a expressão de proteína regulada por glicose (GRP78) que, além de agir como um cofator na entrada viral, liga-se à esporos revestidos por invasina homólogos de proteína de esporo 3 (CotH3) contidos na superfície fúngica e favorece a invasão de células epiteliais nasais pelo fungo *Mucorales* (CARLOS et al., 2021). Da mesma forma, a interação do peptídeo CotH7 com a integrina α3β1 em células epiteliais alveolares contribui para a progressão da mucormicose pulmonar (ALQARIHI et al., 2020), e a produção de mucoricina pela forma de hifa do fungo Mucorales promove danos vasculares que permitem um maior recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido, favorecendo assim o estado hiperinflamatório (SOLIMAN et al., 2021). Estudos apontam que uma proporção substancial de pacientes com COVID-19 que necessitam de tratamento em unidade de terapia intensiva, nutrição parenteral e ventilação mecânica, juntamente com a terapia corticosteroide sistêmica, são mais predispostos infeccões а com Candida spp (DE ALMEIDA et al., 2021), sendo a incidência por essa infecção de duas a dez vezes maior em pacientes com COVID-19 (DE ALMEIDA et al., 2021; HANSON et al., 2021; KAYAASLAN et al., 2021).

Nesse sentido, sabe-se que, de maneira geral, a infecção prévia com o SARS-CoV-2 seguido da infecção por outros patógenos é capaz de gerar piora substancial ao quadro clínico do paciente, sobretudo em relação a patógenos fúngicos. Contudo, são escassos os estudos que abordam sobre a infecção prévia de fungos seguida da infecção com o vírus SARS-CoV-2. E, embora sejam negligenciadas, é importante considerar que as infecções fúngicas são um grande problema de saúde pública, tanto em indivíduos saudáveis quanto em imunossuprimidos. Desse modo, com intenção de avaliar os efeitos da coinfecção por dois patógenos que infectam o sistema respiratório, o objetivo do nosso estudo foi avaliar se a infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* influencia no curso da infecção subsequente pelo vírus SARS-CoV-2 em camundongos transgênicos para o receptor ACE2 humano, bem como determinar os mecanismos de proteção ou lesão que estão envolvidos durante essa interação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar se a infecção prévia com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* altera o curso da infecção por SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o infiltrado inflamatório e a carga viral no tecido pulmonar de animais previamente infectados por *P. brasiliensis* e coinfectados com SARS-CoV-2.

- Caracterizar o infiltrado inflamatório (células mieloides e linfoides) presentes no tecido pulmonar de animais previamente infectados por *P. brasiliensis* e coinfectados com SARS-CoV-2.

- Avaliar a expressão de citocinas e quimiocinas presentes no tecido pulmonar de animais previamente infectados por *P. brasiliensis* e coinfectados com SARS-CoV-2.

Determinar os mecanismos relacionados com a proteção e/ou lesão pulmonar de animais previamente infectados por *P. brasiliensis* e coinfectados com SARS-CoV2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de leveduras de P. brasiliensis

Os isolados da cepa 18 de *P. brasiliensis* foram cultivados em meio BHI (Brain Heart Infusion – ágar) suplementado com 5% de D(+) Glicose Anidra (C₆H₁₂O₆) (Sigma Aldrich), gentamicina (48µg/mL) e 5% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbed, CA, EUA) por 10 a 15 dias à 37°C. Para preparar o inóculo, as colônias do isolado 18 de *P. brasiliensis* foram transferidas para um falcon contendo 10 mililitros de solução de tampão fosfato salino (PBS 1x) estéril, em seguida, a mistura foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi dispensado e o precipitado ressuspendido em PBS 1x estéril para contagem em câmara de Neubauer.

3.2 Viabilidade das leveduras

Para determinar a viabilidade das leveduras, 100µL da suspensão do fungo 1x10⁷ leveduras/ml, foi incubada durante 15 minutos em estufa a 37°C, com 100 µL de diacetado de fluoresceína (DAF) (2mg/mL) e 100µL de brometo de etídeo (50mg/mL). A contagem de leveduras viáveis foi determinada por meio da análise de fluorescência das leveduras marcadas, utilizando o microscópio de fluorescência. Sabe-se que as leveduras viáveis têm a propriedade de acumular fluoresceína (Fluocromasia) enquanto o brometo de etídio penetra rapidamente em células danificadas, ligando-se ao DNA por intercalação, formando um complexo vermelho fluorescente com o material nuclear da levedura(V L CALICH, 1979). Sendo então considerada uma boa viabilidade quando aproximadamente 80% das leveduras encontravam-se DAF positivas.

3.3 Produção viral (SARS-CoV-2)

Para a produção viral (estoques virais de trabalho), garrafas contendo células VERO E6 (ATCC, EUA) possuindo no mínimo de 90% de confluência foram utilizadas. A células foram infectadas com 10⁶ PFU do vírus SARS-CoV-2 do nosso estoque viral, diluídos em 2ml de meio Dulbecco's médium (D-MEM - Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em agitador tipo gangorra, para a etapa de adsorção viral. Após essa etapa, foi adicionado 20mL do meio D-MEM com 2% de soro fetal bovino as garrafas, que em seguida foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As garrafas foram acompanhadas diariamente até a constatação de morte celular (observação do início do descolamento celular da garrafa). Em seguida, todo o sobrenadante com conteúdo

viral contido nas garrafas foi coletado e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. Por fim, a suspensão viral foi fracionada em criotubos e as alíquotas imediatamente congeladas a -70 °C. Todos os procedimentos envolvendo o vírus SARS-CoV-2 foram realizados no laboratório de biossegurança nível 3 (NB3) do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.4 Títulação viral

Para a quantificação do vírus SARS-CoV-2, foi realizada a titulação viral por Unidades Formadoras de Placa (PFU) que mede a capacidade dos vírus de formar placas infecciosas por unidade de volume. Para a realização da titulação, as células Vero E6 (2,5x10⁴ células por poço) foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços (Corning, NY, EUA) e incubadas com diferentes concentrações do vírus (diluição seriada de 10X) em um volume total de 500uL por 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 2% de carboximetilcelulose (CMC), solução que impede a infecção e destruição da monocamada celular. Após 5 dias de incubação, as placas foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 1%. As placas foram contadas usando o seguinte cálculo: PFU/mL= Média das placas / Fator de diluição x volume para diluir o vírus.

3.5 Animais experimentais

Os camundongos machos, com 7 a 8 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 e transgênicos k18-hACE2, provenientes Jackson mice, foram obtidos junto ao biotério de criação de animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo/ USP. Todos os animais foram mantidos sob condições livres de patógenos e criados com água e ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da pesquisa animal aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (105/2020).

3.6 Modelo experimental de coinfecção: Pb18 e SARS-CoV-2 e tratamento com anticorpo contra o receptor de interferon do tipo 1

Para a infecção com o fungo Pb18, os camundongos foram inoculados intravenosamente, pelo plexo orbital com 100µL de solução contendo 1x10⁶ leveduras viáveis de Pb18 diluído em solução PBS 1x. Para a infecção com o vírus SARS-CoV-2, animais foram inoculados por via intranasal com 40 µL de solução contendo 5x10⁴ partículas virais diluídas em solução PBS 1x. Para os experimentos de coinfecção, os animais foram previamente infectados com Pb18 conforme descrito acima, e após 30 dias de infecção com Pb18 (caracterizando a fase crônica da doença), os animais foram infectados com SARS-CoV-2, também conforme descrito acima.

Para o bloqueio do receptor de interferon do tipo 1, camundongos k18hACE2 previamente infectados com 1x10⁶ leveduras de Pb18 por 30 dias, foram inoculados 100µg do anticorpo anti-IFNAR (BioXCell) diluídos em 40µL de PBS 1x. Então, 6 horas após a inolulação, os animais foram coinfectados com 5x10⁴ partículas virais de SARS-CoV-2. Os ensaios foram realizados 6 dias após a infecção viral.

Todos os experimentos foram realizados utilizando no mínimo 4 animais por grupo experimental. A porcentagem da perda de peso e a mortalidade dos animais foram acompanhadas diariamente. A porcentagem da perda de peso foi obtida usando o seguinte cálculo: % perda de peso = peso atual x 100 / peso inicial.

3.7 Análise histopatológica

Os lóbulos pulmonares de camundongos de diferentes grupos experimentais foram coletados e fixados em formol tamponado e, após 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70-100%) e clarificados em xilol. Os órgãos foram incluídos em blocos de parafina e cortes de 5µm de espessura foram obtidos com o auxílio do micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados à 60°C para a fixação. O material foi lavado em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratado em concentrações decrescentes de etanol (do absoluto ao 80%). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise do infiltrado inflamatório bem como a formação dos granulomas. As lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil), cobertas com lamínulas e analisadas em microscópio óptico comum.

3.8 Extração de RNA Total

Fragmentos do tecido pulmonar foram obtidos e armazenados à -20°C em 500µL Trizol® (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) até o momento da extração do RNA total. As amostras foram trituradas com auxílio do Tissuelyser LT (Qiagen). E, em seguida, adicionados a mistura 200µL de clorofórmio, que foi centrifugada a 12000g por 15 minutos à 4°C. Após centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada, transferida para outro tubo, homogeneizada com 200µL de etanol 95%. Para a purificação do RNA foram utilizadas as colunas, solução de tratamento com DNase, para redução de contaminação com DNA genômico, e solução de lavagem do kit SV total RNA Isolation System (Promega, Madision, WI, USA), seguindo das instruções do fabricante. O RNA foi quantificado a 260nm de absorbância (A260) em NanoDropTM 1000 Spectrophometer V 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA) ou reação de PCR para quantificação da carga viral de SARS-CoV-2.

3.9 Reação de PCR para Quantificação da carga viral de SARS-CoV-2

Para a quantificação da carga viral das amostras, o RNA foi extraído conforme descrito acima. Para a quantificação relativa da carga viral do RNA das amostras, o PCR foi realizado utilizando o Kit TaqMan Fast Virus 1 (ThermoFisher scientific) conforme orientações do fabricante. Resumidamente, 5 µL do RNA das amostras, com concentração de 20ng/µL, foi adicionado a 5µL de TaqMan Fast Virus (Thermo Fisher Scientific), 1µL dos primers iniciadores (10µM), 0,2µL da sonda molecular (10µM) para a identificação da sequência alvo e 7,8µL de água livre de endonuclases. A amplificação das sequências dos genes alvo foi avaliada por meio da curva exponencial de amplificação após incubação do material à 50°C por 5 minutos, 95°C por 20 minutos, 40 ciclos de repetição de 95°C por 3 minutos e 60°C por 30 minutos.

Para a reação de quantificação relativa da carga viral pela metodologia de curva padrão do RNA viral do SARS-CoV-2, extraímos o RNA viral de amostras (*swab*) sabidamente positivas para COVID-19 que foram previamente isoladas através do kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), o RNA viral foi quantificado a 260nm de absorbância (A260) em NanoDropTM 1000 Spectrophometer V 3.7.1

(Thermo Fisher Scientific), e em seguida, a partir dos valores obtidos foi realizado a construção da curva padrão por diluições em série do RNA viral.

3.10 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de amostras de RNA total, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Em resumo, 500 ng de RNA foram adicionados a uma solução contendo 10x RT Buffer, 25x dNTP (100mM), 0,05µg/µL de Oligo (dT) a 50µM, MultiScribeTM Reverse Transcriptase. Em seguida, as amostras foram submetidas à ciclagem em um termociclador (Modelo PTC-100, M Research, Watertown, MA, EUA). Posteriormente, foi diluída em 180µL de água livre de endonuclease e armazenada à -20°C até o uso.

3.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A expressão de transcritos foi realizada pela técnica de PCR em tempo Real (qPCR) utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Esse sistema (ABI Prism Software) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras por meio da utilização de nucleases fluorogênicas, sendo a expressão normalizada com base em controle endógeno (gene da Proteína Ribosomal L 13 -RPL13, constitutivo). Iniciadores adequados para tais reações, também conhecidos por primers cuja suas sequências estão dispostas no Anexo 1. O cDNA de cada amostra (5 µl) foi adicionado à 7,65 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 0,5 µL do iniciador sense (1-2 µg/reação), 0,5 µL do iniciador anti-sense (1-2 µg/reação) e 1,35 µL de água livre de endonuclases. A amplificação das sequências dos genes alvo e controle interno foi avaliada por meio da curva exponencial de amplificação após incubação do material à 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos (para desnaturação), 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos (para anelamento das seguências iniciadoras) e, 72°C por 30 segundos. A positividade da reação foi determinada baseando-se em controles negativos, não infectados. A expressão gênica foi analisada e quantificada com base no valor da linha de corte Ct (quantification Cycle), definido após o término da reação, ou seja, a partir do ciclo em que a amplificação atingiu um limiar. Os cálculos, para determinação da expressão relativa dos genes alvo, foram realizados de acordo com as instruções contidas no folheto User's Bulletin
(P/N 4303859, Applied Biosysrems), sendo que os dados foram normalizados em relação à expressão constitutiva do RPL13 em cada amostra. Em resumo, foram obtidos os valores de Δ Ct para cada amostra avaliada, sendo que Δ Ct = Ct gene alvo – Ct gene constitutivo. Assim, quanto menor o valor de Δ Ct, maior a expressão do gene de interesse em relação ao gene controle. A expressão de mRNA amostral, em relação ao grupo controle de animais não infectados, foi calculada através da fórmula: Expressão relativa = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, sendo que $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct animal infectado – Δ Ct grupo controle.}

3.12 Dosagem do citocinas por Elisa

Os fragmentos do tecido pulmonar foram coletados, pesados e triturados em inibidor de protease (Complete - Hoffman-La Roche, EUA) para quantificação de citocinas. A dosagem foi realizada segundo o ensaio imunoenzimático do tipo sandwich, pelo kit (Biolegend, San Diego, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Em resumo, placas de poliestireno foram sensibilizadas com tampão de ligação contendo anticorpo de captura e incubadas por 12 horas a 4ºC. Após 3 lavagens com PBS 0,05% Tween 20® (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200µL de PBS 1x com 20% de soro fetal bovino, por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente, conforme descrito acima, e a curva padrão, com concentrações conhecidas e as amostras, foram adicionadas aos poços. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, a placa foi lavada mais uma vez (conforme descrito acima), e 100µL de anticorpo de detecção foi adicionado a cada poço. Mais uma vez a etapa de lavagem foi repetida e, como próximo passo, foi adicionado solução contendo substrato e tetra-methyl-benzidine (TMB) (Biolegend, San Diego, CA, EUA). Depois de 15 minutos, a reação foi finalizada adicionando-se H₂SO₄. A leitura da reação colorimétrica foi realizada a 450nm em leitor de microplacas (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer – Thermo Fisher Scientific) e as concentrações de citocinas foram determinadas a partir dos valores obtidos com curva padrão realizadas com as diferentes diluições conhecidas da proteína recombinante fornecida pelo kit e os resultados foram apresentados na concentração de picogramas por microlitro pg/mL.

3.13 Isolamento de leucócitos do pulmão

O tecido pulmonar foi coletado, fragmentado e, em seguida, incubados durante 30 minutos a 37°C em RPMI-1640 contendo 2mg/ML de Colagenase I (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). Após a digestão enzimática, o macerado proveniente dos fragmentos digeridos, foi filtrado sobre filtros de 50 μm (Filcon, Falcon products). A suspensão celular foi centrifugada a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, ao homogenato celular foi adicionado 1 mL de tampão de lise para eliminação de hemáceas. Após 2 minutos, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 1X, centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspendidas em 2 mL de RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal. Alíquotas celulares foram diluídas 100x em azul de Tripan e a contagem de leucócitos efetuada em câmera de Neubauer. E, em seguida, as células foram incubadas com marcador de viabilidade (Biolegend, San Diego, CA, EUA) por 20 minutos a temperature ambiente. E por fim, as células foram lavadas, submetidas à fixação com PBS-formol 4% por 11 minutos, e após esse período, ressuspendidas em 1mL de PBS 1x até o momento da análise fenotípica por citometria de fluxo.

3.14 Citometria de Fluxo

A caracterização dos leucócitos presentes no tecido pulmonar foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Para tal fenotipagem, avaliamos a expressão dos seguintes marcadores: CD11c (clone N418), CD11b (clone M1/70), Ly6C (clone HK1.4), SIGLEC F (clone E50-2440), MHCII (clone M5/114.15.2), PDCA1 (clone 927), B220 (clone RA3-6B2), CD3 (clone 145-2C11), CD4 (clone RM4-5), CD8 (clone 53-6.7), CD44 (clone IM7) e PD1 (clone EH12.1). Para isso, 1x10⁶ células foram incubadas com cocktail de anticorpos marcados com diferentes fluorocromos diluídos em PBS 1X por 30 minutos a 4 °C. Todos os anticorpos utilizados foram da BD Bioescience ou Biolegend conjugados com diferentes fluorocromos: (FITC, PE, APC, PercP, BV421, BV605, APC-CY7, AF700, AF488 e PE-CY7). Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto e ressuspendidas em 150µL de PBS 1x para a aquisição. A aquisição das células foi realizada no citômetro de fluxo FACSymphony A1 ou FACS Canto II (BD Immunocytometry System). As análises foram feitas com o auxílio do programa FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software v10.0.8.).

3.15 Análise estatística

Para a comparação entre os grupos experimentais, aplicou-se o teste de análise de variância (One-way ANOVA) seguido pelos pós teste Brown–Forsythe. Os valores estão expressos como média ± erro (SEM), sendo que foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentavam p<0,05. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 A infecção crônica com *P. brasiliensis* induz resistência à infecção por SARS-CoV-2

Com intuito de determinar se a infecção prévia com o fungo *P. brasiliensis* interfere na infecção subsequente pelo vírus SARS-CoV-2, os camundongos k18hACE2 foram inoculados por via endovenosa com 1x10⁶ unidades formadoras de colônia (CFU) e após 30 dias coinfectados, pela via intranasal, com 5x10⁴ unidades formadoras de placa (PFU) do vírus SARS-CoV-2 (Figura 4A). Em seguida, avaliamos a perda de peso e a sobrevida por 18 dias. Os resultados mostraram que 100% dos animais infectados com SARS-CoV-2 perderam peso continuamente a partir do 4º dia pós-infecção (dpi) (Figura 4B), e vieram a óbito entre o 7º e 8º dpi (Figura 4C). Em contraste, os camundongos coinfectados apresentaram uma menor perda de peso comparado com aqueles somente infectados sucumbiram a infecção (Figura 4 B e C). É importante salientar, que os animais somente infectados com Pb18 não perdem peso e sobrevivem durante o curso da infecção.



Figura 4. Camundongos k18hACE2 infectados com Pb18 são resistentes à infecção com SARS-CoV-2. (A) Desenho esquemático do modelo de coinfecção Pb18 e SARS-CoV-2 que consiste na infecção de animais k18hACE2 com 1x10⁶ CFU de Pb18 pela via intravenosa e, após 30 dias de infecção, um grupo de animais foram coinfectados pela via intranasal com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. Os ensaios imunológicos foram realizados no dia 6 após a infecção com SARS-CoV-2. Camundongos k18hACE2 foram infectados com Pb18 somente, ou coinfectados com SARS-CoV-2, ou infectados somente com SARS-CoV-2. (B) A porcentagem de perda de peso e (C) sobrevida foram avaliados diariamente. (D) A carga viral no tecido pulmonar foi determinada após 6 dias de infecção com SARS-CoV-2 por qPCR. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2

experimentos independentes e representam a média \pm SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Em seguida, no 6º dia pós-infecção com SARS-CoV-2, a carga viral e o infiltrado inflamatório foram avaliados no tecido pulmonar por qPCR e coloração com H&E, respectivamente. De maneira interessante, os animais coinfectados apresentaram uma baixa carga viral no tecido pulmonar comparados com aqueles somente infectados com SARS-CoV-2 (Figura 4D).

Em relação à análise histopatológica, os animais do grupo controle (não infectados) mostraram que não houve alterações morfológicas pulmonares (Figura 5 NI). No entanto, o pulmão do grupo infectado com Pb18 apresentou granulomas difusos (seta preta) por todo tecido pulmonar com a presença de leveduras, porém possui regiões aparentemente normais, com alvéolos bem expandidos (Figura 5 Pb18). Em contrapartida, no pulmão do grupo infectado com SARS-CoV-2 observamos regiões de colapso alveolar (asterisco), hiperemia dos vasos sanguíneos (seta vermelha) associado à presença de infiltrado inflamatório moderado, predominantemente mononuclear, com maior acúmulo de células inflamatórias nas regiões peribroncovascular (seta branca) (Figura 5 SARS-CoV-2). Em compensação, a análise do tecido pulmonar do grupo coinfectado mostra colapso alveolar focal (asterisco), com mais preservação alveolar, associado a infiltrado inflamatório leve no espaco intersticial e a presenca de granulomas com células inflamatórias mistas (seta preta) (Figura 5 Pb18+SARS-CoV-2). Assim, é possível inferir que o tecido pulmonar dos animais coinfectados apresenta menor infiltrado inflamatório intersticial em comparação ao grupo infectado apenas com o vírus.

Em conjunto, os resultados indicam que animais previamente infectados com Pb18 são mais resistentes a infecção por SARS-CoV-2.



Figura 5. Camundongos k18hACE2 infectados com Pb18 apresentam menor infiltrado inflamatório pulmonar frente à infecção com SARS-CoV-2. Fotomicrografias representativas de tecido pulmonar de animais não infectados (NI), infectados com Pb18 (Pb18), com SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2) e coinfectados (Pb18+SARS-CoV-2). Granulomas (seta preta), colapso alveolar (asterisco), vasos hiperêmicos (seta vermelha), região peribroncovascular (seta branca) e colapso alveolar (asterisco). Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

4.2 Camundongos coinfectados apresentam menor carga viral em diferentes órgãos e em diferentes estágios da infecção por SARS-CoV-2

Embora a COVID-19 seja considerado principalmente uma doença respiratória, o SARS-CoV-2 pode infectar múltiplos órgãos (KUMARI et al., 2021; SONG et al., 2021; WANG et al., 2020b; YANG et al., 2021). Devido à baixa carga viral encontrada nos pulmões dos animais coinfectados, o próximo passo foi quantificar partículas virais em outros tecidos e em diferentes tempos da infecção por SARS-CoV-2. Para isso, animais k18hACE2 foram previamente infectados com Pb18 e após 30 dias desafiados com SARS-CoV-2. Em diferentes tempos após a infecção viral (2, 4 e 6 dpi), o pulmão, coração, baço e cérebro foram coletados e a carga viral determinada por qPCR. No 2º dpi já foi possível detectar material genético no tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2, sendo o pico no 4º dpi, já os animais coinfectados, como mostrado anteriormente, apresentaram uma menor quantidade do material genético viral comparado com os aqueles somente infectados com SARS-CoV-2 em todos os períodos avaliados. (Figura 6A). Os animais infectados com SARS-CoV-2 apresentaram pico da expressão de material genético viral no coração (Figura 6B) e baço (Figura 6C) no 4º dpi, já no cérebro, somente no 6º dpi foi possível detectar o material genético do vírus (Figura 6D). Em todos os órgãos analisados, a carga viral estava reduzida nos camundongos coinfectados quando comparado aos camundongos infectados apenas com o vírus. Esses resultados mostram que a infecção prévia com Pb18 atenua a replicação viral no hospedeiro durante o curso da infecção por SARS-CoV-2, impedindo a disseminação viral pelos tecidos do hospedeiro.





4.3 Caracterização de células mieloides para o tecido pulmonar de animais coinfectados Pb18 e SARS-CoV-2

As respostas imunes inatas e adaptativas desordenadas podem causar danos aos tecidos do hospedeiro, especialmente durante a fase aguda da infecção por SARS-COV-2 (HOSSEINI et al., 2020). Dessa forma, com o intuito de avaliar os efeitos da coinfecção na resistência ao SARS-CoV-2, o próximo passo foi quantificar os leucócitos infiltrantes no tecido pulmonar dos animais. Para isso, no 6º dia após infecção com SARS-CoV-2, o tecido pulmonar foi coletado, as células do tecido pulmonar isoladas e analisadas por citometria de fluxo. Primeiramente, analisamos as células mieloides presentes no tecido pulmonar dos animais quanto a expressão de CD11b e CD11c conforme mostrado na (Figura 7A). No tecido pulmonar de animais infectados cronicamente com Pb18 existe um predomínio de células mieloides simples positivas CD11C⁺ (Figura 7A e B). No entanto, a infecção com SARS-CoV-2 leva a uma redução significativa da frequência e do número absoluto de células CD11c⁺ e um aumento significativo de células CD11b⁺ (Figura 7A e C) comparado com os animais somente infectados com Pb18. Já os animais coinfectados apresentaram uma alta frequência e número absoluto de células CD11b+CD11c+ comparado aos infectados com Pb18 ou com SARS-CoV-2 (Figura 7A e D). Esses dados mostram que a migração de células mieloides são diferentes durante o curso das infecções, sugerindo que a infecção prévia com o fungo Pb18 alterou o perfil de células migratórias durante a infecção com SARS-CoV-2.



Figura 7. Quantificação de células mieloides no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo quanto a frequência de células positivas para CD11b e CD11c. (B-D) A frequência e o número absoluto de células mieloides (B) CD11c⁺CD11b⁺, (C) CD11c⁺CD11b⁺ e (D) CD11c⁻CD11b⁺ presentes no tecido pulmonar de animais em diferentes grupos experimentais. (NI) camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Devido à redução de células CD11c⁺ no tecido pulmonar de animais infectados com SARS-CoV-2, caracterizamos qual população celular que expressa CD11c e está comprometida durante a infecção viral.

As principais células que expressam CD11c no tecido pulmonar são os macrófagos alveolares e as células dendríticas. O delineamento experimental foi realizado conforme mostrado na **Figura 4**. No dia 6º dpi, os leucócitos foram isolados e caracterizados. Os pulmões de animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram uma redução significativa na frequência de macrófagos alveolares (CD11c+SiglecF+) comparados com os outros grupos experimentais (**Figura 8A e B**).



Figura 8. Quantificação de macrófagos alveolares no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo da frequência de células positivas para CD11c e SiglecF. (B) A frequência e o número absoluto de macrófagos alveolares (CD11c⁺SiglecF⁺) presentes de animais em diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P<0,05).

Em relação à população de células dendríticas, mais especificamente células dendríticas plasmocitóides (pDC), os animais infectados com SARS-CoV-2 apresentaram uma redução significativa da frequência de pDC (PDCA1+B220+CD11c+CD11b⁻) comparados com os somente infectados com Pb18 ou coinfectados (**Figura 9A e B**).



Figura 9. Quantificação de células dendríticas plasmocitóides no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo quanto a porcentagem de células positivas para B220 e PDCA1 avaliados dentro da população de células CD11c⁺CD11b⁻. (B) A frequência e o número absoluto de células dendríticas plasmocitóides (PDCA1⁺B220⁺CD11c⁺CD11b⁻) presentes no tecido pulmonar de animais em diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Outra subpopulação de células dendríticas são as derivadas de monócitos (Mo-DC). De maneira similar as pDC, os animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram uma redução significativa do número absoluto de Mo-DCs (Ly6C⁺MHCII⁺CD11b⁺CD11c⁺) no tecido pulmonar comparados com somente infectados com Pb18 e coinfectados (**Figura 10A e B**).



Figura 10. Quantificação de células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo quanto a porcentagem de células positivas para LY6C e MHCII avaliados dentro da população de células CD11c⁺CD11b⁺. (B) A frequência e o número absoluto de células dendríticas derivadas de monócitos (Ly6C⁺MHCII⁺CD11b⁺), presentes no tecido pulmonar de animais em diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Dando continuidade a caracterização de células mieloides no tecido pulmonar, os pulmões dos animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram uma alta frequência e número absoluto de monócitos inflamatórios (CD11b+Ly6C+) comparado com os infectados com Pb18 e coinfectados (Figura 11A e B). Esses dados em conjunto mostram que a infecção prévia com Pb18 impede a migração intensa de monócitos inflamatórios e favorece o recrutamento de células dendríticas pDC e Mo-DCs bem como a manutenção de macrófagos alveolares no tecido pulmonar durante a infecção com SARS-CoV-2.



Figura 11. Quantificação de monócitos inflamatórios no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo mostrando a porcentagem de células positivas para CD11b⁺ e Ly6C⁺. (B) A frequência e o número absoluto de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C⁺) presentes no tecido pulmonar dos animais em diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

4.4 Caracterização de linfócitos T no tecido pulmonar de animais infectados com Pb18 e SARS-CoV-2

Na COVID-19, pacientes com quadro grave da doença possuem respostas de célula T prejudicadas comparados com os pacientes assintomáticos ou leves (GAO et al., 2021). Em seguida, os leucócitos do tecido pulmonar dos animais dos diferentes grupos experimentais foram isolados e quantificados quanto a expressão de marcadores que caracterizam os linfócitos T.

Nossos dados mostram que os pulmões dos animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram uma menor frequência e número absoluto de linfócitos totais representados em relação ao tamanho e granulosidade comparados com os outros grupos experimentais (Figura 12A e B). De maneira similar, houve uma redução



significativa de linfócitos T (CD3⁺) no pulmão dos animais infectados com SARS-CoV-2 comparado com aqueles infectados com Pb18 e coinfectados (Figura 12C).

Figura 12. Quantificação de linfócitos T no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1×10^6 leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5×10^4 PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo da porcentagem de linfócitos totais em relação aos parâmetros de tamanho e granulosidade. (B) A frequência e o número absoluto de linfócitos totais e (C) linfócitos T (CD3⁺) infiltrantes do tecido pulmonar de diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média \pm SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Mais especificamente, os linfócitos T CD4⁺ estão reduzidos no tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2 comparados com os infectados com Pb18 e coinfectados (Figura 13A e B). Apesar das células T CD8⁺ terem apresentado uma maior frequência durante a infecção com SARS-CoV-2 comparado aos outros grupos experimentais, em relação ao número de células, esse aumento não foi observado. (Figura 13A e C).



Figura 13. Quantificação de linfócitos T CD4+ e CD8+ no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. (A) Dot plot representativo da porcentagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ avaliados na população de CD3⁺. (B e C) Os gráficos mostram a frequência e o número absoluto de linfócitos T CD4+ e T CD8+, respectivamente, no tecido pulmonar dos animais dos diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Em seguida, avaliamos a expressão de marcadores de ativação (CD44⁺) e inibição (PD-1) em linfócitos T. Corroborando com dados de quantificação de linfócitos T, no tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2, houve redução do número de linfócitos T ativados (CD4⁺CD44⁺) comparados com os animais somente infectados com Pb18 (Figura 14A). Em relação à ativação de células T CD8, apesar dos animais infectados com SARS-CoV-2 exibirem aumento da frequência de células T CD8⁺CD44⁺, o número absoluto dessas células foi similar entre os grupos (Figura 14B). Em contrapartida, uma alta frequência de células T CD4⁺PD-1⁺ e CD8⁺PD-1⁺ foi observado no pulmão de animais infectados com SARS-CoV-2 comparado com os animais infectados com Pb18 somente (Figura 14C e D). No entanto, o número absoluto de linfócitos T CD4⁺PD-1⁺ e CD8⁺PD1⁺ foram similares entre os outros grupos experimentais. Esses dados em conjunto sugerem que a infecção com SARS-CoV-2 compromete a migração de linfócitos T para o tecido pulmonar, enquanto nos



animais coinfectados a migração dessas células para o tecido pulmonar não é prejudicada.

Figura 14. Expressão das moléculas CD44 e PD-1 em linfócitos T no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos K18hACE2 foram previamente inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras de Pb18 e, após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, os leucócitos foram isolados do pulmão e quantificados por citometria de fluxo. A frequência e o número absoluto de linfócitos T CD4 e CD8 expressando (**A e B**) CD44 e (**C e D**) PD-1 no tecido pulmonar dos animais em diferentes grupos experimentais. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

4.5 A infecção prévia com o fungo *P. brasiliensis* reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por SARS-CoV-2

Durante a infecção por SARS-CoV-2 há uma robusta produção de citocinas pró-inflamatórias associada com pior prognóstico da doença (HU; HUANG; YIN, 2021). Sabendo que a infecção prévia com Pb18 confere resistência a infecção por SARS-CoV-2 com controle da carga viral, manutenção da população de MA, maior migração de pDCs, Mo-DCs e linfócitos, e ainda menor migração de monócitos inflamatórios para o tecido pulmonar, em nosso próximo passo determinamos a expressão de citocinas e quimiocinas relacionadas com diferentes perfis de respostas

imunológicas no pulmão de animais infectados com Pb18 e coinfectados com SARS-CoV-2.

No tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2 exibiram uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF-α e IFN-γ, relacionadas com o perfil de resposta Th1, comparado com os animais coinfectados ou somente infectados com Pb18 (Figura 15A-C). O aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2 foi acompanhado de alta expressão da citocina IL-10, comparados com animais somente infectados com Pb18 (Figura 15D). É importante salientar que apesar dos animais coinfectados apresentarem uma baixa expressão das citocinas pró-inflamatórias, a expressão de IL-10 foi similar aos animais somente infectados com SARS-CoV-2 (Figura 15D).

Em contraste, a expressão de IL-17, produzida principalmente pelas células Th17, que possui papel essencial no controle de infecções fúngicas (BETTELLI et al., 2008; KETELUT-CARNEIRO et al., 2019), teve sua expressão reduzida no pulmão de animais infectados somente com SARS-COV-2 e coinfectados, quando comparado com animais somente infectados com Pb18 (Figura 15F). Já a expressão da citocina IL-4, característica do perfil Th2, foi similar entre os grupos experimentais (Figura 15E). Assim como as citocinas pró-inflamatórias, as quimicionas CCL2 e CXCL10 estão aumentadas no tecido pulmonar dos animais infectados com SARS-CoV-2 comparados aos coinfectados ou infectados com Pb18 (Figura 15G e H). Esses resultados em conjunto mostram que a infecção prévia com Pb18 atenua a expressão das citocinas e quimiocinas induzidas durante a infecção com SARS-CoV-2.



Figura 15. Expressão gênica de citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar de animais coinfectados ou não com Pb18 e SARS-CoV-2. Camundongos k18hACE2 foram inoculados ou não com 1x10⁶ leveduras Pb18, e após 30 dias, coinfectados ou não com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2. No dia 6 após a infecção com SARS-CoV-2, um fragmento do pulmão foi coletado para avaliar a expressão relativa dos seguintes genes (A) IL-12, (B) TNF- α , (C) IFN- γ , (D) IL-10, (E) IL-4, (F) IL-17, (G) CCL2 e (H) CXCL10 pela técnica de PCR em tempo Real (qPCR). (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

4.6 Interferon do tipo 1 é necessário para a resistência dos camundongos coinfectados

Os Interferons tipo I são polipeptídeos que são secretados por células infectadas que induzem o estado antiviral, modulam as respostas imunes inatas e ativam o sistema imunológico adaptativo (IVASHKIV; DONLIN, 2014). Devido o controle da carga viral nos animais coinfectados, na próxima etapa investigamos se a via de sinalização do IFN-1 estava envolvida na resistência dos animais. Primeiramente, avaliamos a expressão das citocinas IFN- α e IFN- β no tecido pulmonar dos animais. Nossos dados mostram que apesar da expressão dos genes IFN- α (**Figura 16A**) e IFN- β (**Figura 16B**) não apresentarem diferença estatística entre os grupos experimentais, uma alta produção de IFN- β foi detectada no tecido pulmonar dos animais infectados com Pb18 comparados com os animais infectados com SARS-CoV-2 (**Figura 16C**). É importante salientar que a produção de IFN- β foi similar entre

os grupos infectados com Pb18 e coinfectados. Esses resultados indicam que a infecção prévia com Pb18 mantém a alta produção dessa citocina durante a infecção com SARS-CoV-2, podendo este ser um importante fator que leva a diminuição da severidade da doença causada pelo vírus. A partir desse resultado, avaliamos se a resistência conferida nos animais previamente infectados com Pb18 à infecção com SARS-CoV-2 era dependente da via de sinalização do IFN-1. Para isso, os camundongos previamente infectados ou não com Pb18 foram tratados com anticorpo neutralizante contra receptor de IFN-1 (anti-IFNAR) conforme mostrado no desenho esquemático (Figura 16D). Após 6 horas da administração do anticorpo neutralizante. os animais foram infectados com SARS-CoV-2 e a porcentagem de perda de peso e sobrevida determinados ao longo de 18 dias. De maneira interessante, os animais coinfectados que receberam anticorpo neutralizante anti-IFNAR apresentaram perda de peso similar aos somente infectados com SARS-CoV-2 (Figura 16E), enquanto os animais coinfectados mantiveram o peso durante todo o período avaliado. Ainda, 75% dos animais coinfectados que receberam anticorpo neutralizante contra receptor do IFN-1 sucumbiram à infecção com SARS-CoV-2, enquanto os coinfectados, não tratados, tiveram 100% de sobrevida (Figura 16F).



Figura 16. A proteção mediada pela infecção por Pb18 contra SARS-CoV-2 é dependente da via de sinalização de IFN tipo. Camundongos K18hACE2, previamente infectados (30 dias) ou não com

1x10⁶ CFU de Pb18, foram coinfectados com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2 e 6 dias mais tarde um fragmento do tecido pulmonar foi coletado e a expressão relativa de (A) IFN-α e (B) IFN-β avaliada por qPCR. (C) A dosagem de IFN-β no tecido pulmonar foi determinada por Elisa. (D) os camundongos K18hACE2, previamente infectados ou não com Pb18, foram tratados com 100 ug/40ul do anticorpo neutralizante contra receptor interferon do tipo I, por via intranasal, conforme mostrado no desenho esquemático. Após 6 horas da administração do anticorpo neutralizante, os animais foram coinfectados com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2 e (E) a porcentagem de perda de peso e (F) sobrevida determinados ao longo de 14 dias. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes e representam a média ± SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Adicionalmente, no 6° dia pós-infecção com SARS-CoV-2, o pulmão e cérebro foram coletados para quantificar o material genético viral por qPCR. Os animais coinfectados tratados com anticorpo neutralizante contra receptor de IFN-1 apresentaram uma maior carga viral no pulmão (Figura 17A) e cérebro (Figura 17B), o que foi confirmado pela contagem das unidades formadora de placas no pulmão (Figura 17C), comparado com os animais coinfectados.

Em conjunto, esses resultados demonstram que a resistência a infecção letal de SARS-CoV-2 conferida nos animais previamente infectados com Pb18 é dependente da via de sinalização do IFN-1.



Figura 17. O bloqueio da sinalização da via de interferon do tipo 1 aumenta a replicação viral de SARS-CoV-2. Os camundongos K18hACE2 previamente infectados ou não com 1x10⁶ CFU de Pb18 e, após 30 dias, foram tratados com anticorpo neutralizante contra receptor interferon do tipo I (100ug). Após 6 horas da administração do anticorpo neutralizante, os animais foram coinfectados com 5x10⁴ PFU de SARS-CoV-2 e a quantificação do genoma viral determinado no **(A)** tecido pulmonar e **(B)** cerebral 6 dias mais tarde por qPCR. O número de partículas virais foi determinado no pulmão **(C)** no 6^o dia após a infecção por SARS-CoV-2. (NI) Camundongos não infectados. Os dados são

representativos de 2 experimentos independentes e representam a média \pm SEM de 5 camundongos por grupo experimental (*P< 0,05).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a infecção prévia com Pb18 inibe a perda de peso e diminui a mortalidade, inflamação e carga viral pulmonar, altera o perfil celular existente nos pulmões durante a infecção viral, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, e leva a produção de IFN-1 que protege os animais de uma infecção subsequente com SARS-CoV-2.

5. DISCUSSÃO

A COVID-19, atribuída à síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2, foi declarada pandemia global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020, essa doença, principalmente na sua forma grave, leva a sobrecarga do sistema imune do hospedeiro, deixando o paciente vulnerável às infecções oportunistas, principalmente em ambientes hospitalares (AL-TAWFIQ et al., 2021; BAI et al., 2021; FATTORINI et al., 2020; MOSER et al., 2021). Sob outra perspectiva, em nossos estudos avaliamos como um indivíduo previamente infectado com um patógeno fúngico que infecta principalmente o trato respiratório se comportaria diante de uma posterior infecção com o vírus SARS-CoV-2. Constatamos com grande surpresa, que uma infecção prévia com o fungo Pb18 leva a resistência a infecção com o vírus SARS-CoV-2. Para isso, em nossos experimentos, nós mimetizamos a COVID-19 na forma grave, utilizando um modelo de infecção em animais suscetíveis, camundongos que expressam a ACE-2 humana e comparamos com a coinfecção, animais previamente infectados com Pb18, o que pode ser associado com a forma leve dessa doença. Os nossos dados reproduzem vários dos fenômenos vistos em pacientes, como a maior quantidade de DCs, MAs e linfócitos no tecido pulmonar, menor quantidade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de infiltrado inflamatório no tecido pulmonar. Na ausência de Pb18, SARS-CoV-2 entra nas células do hospedeiro, se propaga e desencadeia uma resposta inflamatória que se estende após o espalhamento do vírus, contudo na presença de Pb18, a extensão da propagação de SARS-CoV-2 é baixa, bem como as respostas imunopatológicas tipicamente desencadeadas nos camundongos, como perda de peso, inflamação e o alastro da replicação viral para os diversos tecidos do hospedeiro, impedindo ou diminuindo patologia e a incidência de morte devido à doença COVID-19 induzida nos camundongos.

Infecções respiratórias, como a infecção pelo SARS-CoV-2, têm como alvo as células epiteliais no trato respiratório (DEINHARDT-EMMER et al., 2021). Esse tipo celular comunica-se com macrófagos alveolares utilizando diferentes mecanismos para manter a homeostase pulmonar e eliminar patógenos, induzindo respostas imunes protetoras e removendo partículas inócuas (BISSONNETTE et al., 2020; BOADA-ROMERO et al., 2020; GORITZKA et al., 2015; HUSSELL; BELL, 2014). Em nossos resultados observamos uma diminuição considerável no número de MAs nos camundongos infectados apenas com SARS-CoV-2, o que possivelmente tem relação com o dano pulmonar gerado durante a COVID-19 grave (LAX et al., 2020; MULKA et

al., 2022), em contrapartida, camundongos infectados com os dois patógenos mantiveram o número de MAs no tecido pulmonar, esse tipo celular é um grande determinante das respostas iniciais a infecções por vírus respiratórios, sendo provavelmente as primeiras células a encontrar, reconhecer e participar da indução das respostas imunes contra o SARS-CoV-2 (DALSKOV et al., 2020). Em concordância, estudos avaliando o lavado broncoalveolar de pacientes com forma grave da doença, observaram um esgotamento de MAs residentes dos tecidos e sua substituição por macrófagos derivados de monócitos inflamatórios (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021).

Em nossos dados demonstramos também como a infecção prévia por Pb18 ameniza a migração de monócitos inflamatórios para o pulmão, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção por SARS-CoV-2. Ao longo de uma infecção viral, ocorre grande produção da quimiocina CCL-2 por células epiteliais infectadas, atraindo macrófagos e monócitos para o sítio da infecção (HEROLD et al., 2006), em seguida, essas células podem montar respostas inflamatórias que podem levar a destruição do epitélio e das vias aéreas (BAHAROM et al., 2017; HEROLD et al., 2006; LAMBRECHT, 2006). Concomitante a isso, o SARS-CoV-2 se replica majoritariamente na camada epitelial do trato respiratório e induz uma resposta inflamatória aguda e robusta seguida pela destruição do epitélio (DEINHARDT-EMMER et al., 2021). A eliminação de células apoptóticas por macrófagos (eferocitose), induz o macrófago a mudança do seu perfil clássico (próinflamatório) para o perfil alternativo (anti-inflamatório) e assim essa célula promove a resolução da inflamação, que pode ser desencadeada por moléculas derivadas da degradação fagolisossomal das partículas apoptóticas (DEINHARDT-EMMER et al., 2021). Defeitos na detecção, ingestão e degradação dessas partículas apoptóticas por meio da eferocitose causam inflamação crônica e doenças autoimunes (BOADA-ROMERO et al., 2020; SALINA et al., 2022; SNELGROVE et al., 2008). Assim, a infecção prévia com o fungo atenua a tempestade de citocinas induzida pela infecção com o SARS-CoV-2, do mesmo modo, atenua a migração de monócitos inflamatórios para o sítio da infecção, que são células envolvidas na defesa do hospedeiro, mas que também podem estar envolvidas em danos gerados aos tecidos (BREWER; ROBINSON; LANZ, 2022; SALINA et al., 2022). Esse tipo celular pode produzir abundantemente diferentes tipos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que

contribuem para a inflamação do tecido local e uma resposta inflamatória sistêmica danosa denominada tempestade de citocinas.

As DCs encontradas nas vias aéreas funcionam em diferentes estágios durante infecção, e possuem como função apresentar continuamente antígenos aos linfócitos T e moldar suas respostas na maioria através da secreção de citocinas (BOUAYAD, 2020; MELLMAN, 2013). Em nossos dados, existe um diferente perfil de células mieloides em cada tipo de infecção, as células que são CD11c⁺, predominantemente células dendríticas, estão presentes durante a infecção por Pb18 apenas e durante a coinfecção, sugerindo melhor capacidade de regulação das respostas imunes comparado a infecção por SARS-CoV-2. Reforçando essa teoria, dados da literatura que analisaram amostras do lavado bronco alveolar de pacientes com COVID-19 leve, moderado e grave, mostraram mudanças marcantes na composição celular com proporções aumentadas de monócitos e menores proporções de DCs e células T em amostras de pacientes com COVID-19 grave em comparação aos pacientes com doença moderada e leve (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021).

Um tipo de DC explorada em nosso estudo foram as pDCs. Durante a coinfecção a quantidade desse subtipo celular está aumentada quando comparado a infecção por SARS-CoV-2. As pDCs são um tipo único de célula sentinela que pode detectar ácidos nucleicos derivados de patógenos e responder com produção rápida e massiva de interferon do tipo I (REIZIS, 2019). Vários estudos demonstraram que durante a COVID-19 ocorre a diminuição na quantidade de DCs no sangue, no tecido pulmonar e no lavado broncoalveolar de pacientes que desenvolveram a forma grave da doença, em contrapartida, as formas moderada e leve da doença, existe uma maior proporção desses tipos celulares (LIAO et al., 2020; SÁNCHEZ-CERRILLO et al., 2020; ZHOU et al., 2020; ZINGAROPOLI et al., 2021).

Diferente da infecção por SARS-CoV-2 que apresenta a predominância de monócitos pulmonares, durante a coinfecção ocorre um diferente perfil celular contido no tecido pulmonar, com o predomínio de Mo-DCs, uma população de células originárias de monócitos que apresentam antígenos, com capacidade de estimular células T (COILLARD; SEGURA, 2021). Um mecanismo de escape utilizado pelo SARS-CoV-2 consiste na diminuição da expressão de moléculas de superfície celular coestimulatórias e de moléculas de antígeno leucócito humano classe II em DCs, assim interferindo na apresentação de antígenos virais (LAW et al., 2005), essa falta

de maturação nas DCs tem como consequência o aumento progressivo da carga viral de SARS-CoV-2 (PEIRIS et al., 2003).

A infecção prévia com Pb18 leva a uma resposta imune contra o fungo que pode agir de forma inespecífica contra o SARS-CoV-2. Estudos recentes demonstraram que a adaptação funcional de células imunes após uma infecção ou vacinação, induzida por reprogramação epigenética, é responsável por uma memória imune inata, também denominada imunidade treinada (ARTS et al., 2018). As principais células envolvidas na imunidade treinada são monócitos, macrófagos e DCs (NETEA et al., 2020). Durante infecções, as DCs são primordiais para a indução de uma resposta imune eficaz, específica para cada tipo de microrganismo. Se houver atraso na indução da resposta imune inata combinada com a evasão particularmente eficiente pelo vírus, pode ocorrer um aumento na replicação viral no trato respiratório superior e nos pulmões, e posteriormente, as respostas imunes adaptativas não são induzidas (ARUNACHALAM et al., [s.d.]; BLANCO-MELO et al., 2020).

Em nossos resultados, mostramos que existe linfopenia significativa e esgotamento de subconjuntos de linfócitos (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺) nos animais infectados com SARS-CoV-2, por outro lado, essa deficiência não é vista durante a coinfecção. Além disso, o aumento da expressão de moléculas como PD-1 nas células T, assim como visto nas células T CD8⁺ em nossos resultados, pode ser considerado um fator de risco para o aumento da gravidade da COVID-19 (BOBCAKOVA et al., 2021), sendo esse evento inibido ou adiado pela infecção previa com Pb18. Durante a COVID-19, as respostas de células T específicas ao SARS-CoV-2 em pacientes estão associadas à doença mais branda (RYDYZNSKI MODERBACHER et al., 2020; SEKINE et al., 2020). Estudos relataram que a maioria dos pacientes com COVID-19 na forma grave ou que foram ao óbito, apresentaram linfopenia acentuada (CHEN et al., 2020; WANG et al., 2020), sugerindo que as respostas das células T são importantes para o controle e resolução da infecção por esse vírus. Adicionalmente, celúlas T participam da diminuição das fortes respostas imunes inatas envolvidas no dano causado aos tecidos (LUO et al., 2021).

Os macrófagos e monócitos inflamatórios, assim como vários outros tipos celulares, podem produzir IFN-1 frente a infecções virais após a interação entre derivados microbianos e PRRs celulares (GUILLIAMS; LAMBRECHT; HAMMAD, 2013). Em nossos resultados, assim como em outros trabalhos, infecções fúngicas podem induzir a produção de IFN-1 (DEL FRESNO et al., 2013), sendo essa produção

de vital importância para a melhor indução da atividade fungicida por neutrófilos e Mo-DCs (GUO et al., 2020). A resistência a infecção por SARS-CoV-2 é dependente da produção de INF-1 produzida durante a infecção prévia por Pb18. Da mesma forma, altos níveis da expressão de genes induzidos por interferon foram observados em crianças que desenvolveram a COVID-19 na forma leve ou moderada em comparação com crianças não infectadas, ao passo que a concentração desses genes diminuíram em crianças que desenvolveram a COVID-19 na forma grave (TOVO et al., 2021). Infecções por SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, causadores da doença respiratória aguda, têm sido caracterizadas por uma resposta inflamatória desregulada nas quais a produção do IFN-1 é retardada e favorece o acúmulo de monócitos inflamatórios, e consequentemente, a hiperinflamação encontrada na COVID-19 (BOUAYAD, 2020; SHAH et al., 2020).

Apesar da ampla importância e do impacto socioeconômico da micologia médica, infecções fúngicas ainda são bastante negligenciadas em comparação com outros patógenos. A recente pandemia SARS-CoV-2 destacou como as infecções fúngicas oportunistas impactam a morbidade e mortalidade de pacientes cujas resposta imune prejudicada e alterações metabólicas favorecem a sua infecção (AL-TAWFIQ et al., 2021; MOSER et al., 2021). Avaliar também os efeitos de infecções já pré-estabelecidas em pacientes, como a infecção por Pb18, um fungo primário com competência para induzir infecção, frente a infecções subsequentes, como a infecção por COVID-19, podem nos preparar para novas patologias que eventualmente ocorram. Em nossos estudos acreditamos também no potencial pouco reconhecido dos antígenos fúngicos para o tratamento vacinal, onde, por exemplo, mananas fúngicas já estão sendo utilizadas durante a estratégia vacinal contra os vírus da influenza e SARS-CoV-2, induzindo a ativação de células imunes inatas e produção de anticorpos neutralizantes (BORRIELLO et al., 2022). As infecções fúngicas também possuem a capacidade de induzir a produção de IFN-β por DCs através dos receptores de reconhecimento de padrão dectina-1 e 2, mecanismo crucial para a defesa do hospedeiro contra C. Albicans (DEL FRESNO et al., 2013), que podem induzir proteção de forma inespecífica contra diversas infecções, incluindo infecções virais (NETEA et al., 2020).

A infecção prévia com Pb18 provoca uma resposta imune adaptativa que reage com antígenos SARS-CoV-2 e oferece imunidade heteróloga, esse tipo de resposta pode ter relação com o tipo de resposta granulomatosa, ligada a resposta imune do tipo Th2, associadas ao reparo tecidual, o que pode estar inibindo a hiperinflamação induzida durante a COVID-19 na forma grave. De fato, o *Mycobacterium tuberculosis*, outro patógeno que causa o mesmo tipo de padrão de resposta imune, também leva a resistência ao SARS-CoV-2 (ROSAS MEJIA et al., 2022), o que pode apoiar essa hipótese.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que a infecção prévia com Pb18 gera um microambiente favorável que inibe replicação viral nos primeiros dias de infecção por SARS-CoV-2, devido à produção pré-existente da citocina IFN-β, induzida pela infecção fúngica. A persistência viral induz a produção de quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento celular, por exemplo, dos monócitos inflamatórios, e da produção de mediadores pró-inflamatórios, gerando um processo inflamatório intenso no tecido pulmonar, deletério para o hospedeiro. O controle viral impede a destruição de células residentes como macrófagos alveolares e de células dendríticas, criando um ambiente favorável para a geração de uma resposta adaptativa eficiente. A proteção mediada pela infecção por Pb18 contra SARS-CoV-2 é dependente da via de sinalização de IFN-1, uma vez que o bloqueio dessa via, prejudica a sobrevida dos animais, bem como o controle da carga viral. A partir desses resultados, surgem também novas perspectivas para o desenvolvimento de novos experimentos para desvendar todo o mecanismo de proteção conferida nos animais previamente infectados com Pb18 e coinfectados com SARS-CoV-2.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados concluímos que a infecção prévia com o fungo Pb18 altera o curso da infecção por SARS-CoV-2 promovendo à resistência dos animais ao vírus, a qual é dependente da via de sinalização de interferon do tipo I. Nesse sentido, a coinfecção inibe a perda de leucócitos (macrófagos, células dendríticas e linfócitos), assim como reduz a expressão de PD1 por células T CD8+ e de citocinas pró-inflamatórias.

7. REFERÊNCIAS

A Z KAPIKIAN. The coronaviruses. **Dev Biol Stand**, 1975.

ADACHI, A. et al. Estradiol suppresses psoriatic inflammation in mice by regulating neutrophil and macrophage functions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 150, n. 4, p. 909- 919.e8, out. 2022.

AHN, J. H. et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 13, 1 jul. 2021. AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. **Pathogen recognition and innate immunity**. **Cell**, 24 fev. 2006.

ALQARIHI, A. et al. GRP78 and integrins play different roles in host cell invasion during mucormycosis. **mBio**, v. 11, n. 3, 1 maio 2020.

AL-TAWFIQ, J. A. et al. **COVID-19 and mucormycosis superinfection: the perfect storm**. **Infection**Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 out. 2021. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. [s.d.]. ARASTEHFAR, A. et al. **COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA)**—from immunology to treatment. Journal of FungiMDPI AG, , 1 jun. 2020.

ARTS, R. J. W. et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 89-100.e5, 10 jan. 2018.

ARUNACHALAM, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. [s.l: s.n.].

ARUNACHALAM, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<https://www.science.org>.

BAGGEN, J. et al. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. Nature MicrobiologyNature Research, 1 out. 2021.

BAHAROM, F. et al. Human lung mononuclear phagocytes in health and disease. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., 1 maio 2017.

BAI, L. et al. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity. **Cell Research**, v. 31, n. 4, p. 395–403, 1 abr. 2021.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051–1057, jun. 2008.

BISSONNETTE, E. Y. et al. Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. Frontiers in ImmunologyFrontiers Media S.A., 15 out. 2020.

BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development

of COVID-19. Cell, v. 181, n. 5, p. 1036- 1045.e9, 28 maio 2020.

BOADA-ROMERO, E. et al. The clearance of dead cells by efferocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 398–414, 6 jul. 2020.

BOBCAKOVA, A. et al. Immune Profile in Patients With COVID-19: Lymphocytes Exhaustion Markers in Relationship to Clinical Outcome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 15 abr. 2021.

BONFIM, C. V.; MAMONI, R. L.; LIMA BLOTTA, M. H. S. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by Paracoccidioides brasiliensis. **Medical Mycology**, v. 47, n. 7, p. 722–733, 2009.

BORRIELLO, F. et al. An adjuvant strategy enabled by modulation of the physical properties of microbial ligands expands antigen immunogenicity. **Cell**, v. 185, n. 4, p. 614- 629.e21, 17 fev. 2022.

BOUAYAD, A. Innate immune evasion by SARS-CoV-2: Comparison with SARS-CoV. Reviews in Medical VirologyJohn Wiley and Sons Ltd, , 1 nov. 2020.

BREWER, R. C.; ROBINSON, W. H.; LANZ, T. V. SARS-CoV-2 infection of monocytes: balancing acts of antibodies and inflammasomes. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 250, 23 dez. 2022.

BRODIN, P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. Nature MedicineNature Research, 1 jan. 2021a.

BRODIN, P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. Nature MedicineNature Research, 1 jan. 2021b.

BROWN, G. D.; GORDON, S.; WILLIAM, S. Minireview Fungal-Glucans and Mammalian ImmunityImmunity. [s.l: s.n.].

CAMPANA, P. et al. Dendritic Cells and SARS-CoV-2 Infection: Still an Unclarified Connection. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2046, 8 set. 2020.

CANTEROS, C. E. PARACOCCIDIOIDOMICOSIS: CRÓNICA DE UNA ENFERMEDAD OLVIDADA. v. 3, p. 180–184, 2018.

CARLOS, A. J. et al. The chaperone GRP78 is a host auxiliary factor for SARS-CoV- 2 and GRP78 depleting antibody blocks viral entry and infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 1 jan. 2021.

CAVASSANI, K. A. et al. Cell-free antigens from Paracoccidioides brasiliensis drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011. CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 13 abr. 2020. COILLARD, A.; SEGURA, E. Antigen presentation by mouse monocyte-derived cells: Re-evaluating the concept of monocyte-derived dendritic cells. **Molecular Immunology**, v. 135, p. 165–169, jul. 2021.

DALSKOV, L. et al. SARS-CoV-2 evades immune detection in alveolar macrophages. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, 3 dez. 2020.

DE ABREU E SILVA, M. À. et al. Important aspects of oral paracoccidioidomycosis-a literature review. Mycoses, maio 2013.

DE ALMEIDA, J. N. et al. Emergence of candida auris in brazil in a covid-19 intensive care unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 1 mar. 2021.

DE OLIVEIRA, L. L. et al. T helper 1-inducing adjuvant protects against experimental paracoccidioidomycosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 3, mar. 2008.

DEINHARDT-EMMER, S. et al. SARS-CoV-2 Causes Severe Epithelial Inflammation and Barrier Dysfunction. Journal of Virology, v. 95, n. 10, 26 abr. 2021a.

DEINHARDT-EMMER, S. et al. SARS-CoV-2 Causes Severe Epithelial Inflammation and Barrier Dysfunction. Journal of Virology, v. 95, n. 10, 26 abr. 2021b.

DEL FRESNO, C. et al. Interferon-β Production via Dectin-1-Syk-IRF5 Signaling in Dendritic Cells Is Crucial for Immunity to C. albicans. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1176–1186, jun. 2013.

DEMIREL, K. J.; GUIMARAES, A. N.; DEMIREL, I. Effects of estradiol on the virulence traits of Porphyromonas gingivalis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 13881, 16 ago. 2022.

DINARELLO, C. A. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology IL-18: A T H1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. [s.l: s.n.]. DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. Annual Review of Immunology, v. 27, n. 1, p. 519–550, 1 abr. 2009.

DOSCH, S. F.; MAHAJAN, S. D.; COLLINS, A. R. SARS coronavirus spike protein-induced innate immune response occurs via activation of the NF- κ B pathway in human monocyte macrophages in vitro. **Virus Research**, v. 142, n. 1–2, p. 19–27, jun. 2009.

FATTORINI, L. et al. Bacterial coinfections in COVID-19: An underestimated adversary. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita, v. 56, n. 3, p. 359–364, 1 jan. 2020.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; LIN, P. L. Macrophages and control of granulomatous

inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 271–278, 23 maio 2011. GAO, C. et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Interacts with Multiple Innate Immune Receptors. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 30 jul. 2020.

GAO, L. et al. The dichotomous and incomplete adaptive immunity in COVID-19 patients with different disease severity. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

GORITZKA, M. et al. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. Journal of Experimental Medicine, v. 212, n. 5, p. 699–714, 4 maio 2015.

GRABIEC, A. M.; HUSSELL, T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 4, p. 409–423, 8 jul. 2016.

GROSS, O. et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. **Nature**, v. 442, n. 7103, p. 651–656, 10 ago. 2006.

GU, S. et al. Alterations of the gut microbiota in patients with coronavirus disease 2019 or H1N1 influenza. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 10, p. 2669–2678, 15 nov. 2020.

GU, Y. et al. Interaction network of SARS-CoV-2 with host receptome through spike protein. **Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology**, 2000.

GUILLIAMS, M.; LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 3, p. 464–473, 3 maio 2013.

GUO, Y. et al. During Aspergillus Infection, Monocyte-Derived DCs, Neutrophils, and Plasmacytoid DCs Enhance Innate Immune Defense through CXCR3-Dependent Crosstalk. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 1, p. 104-116.e4, jul. 2020.

HANSON, B. M. et al. Candida auris invasive infections during a COVID-19 case surge. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 65, n. 10, 1 out. 2021.

HARDISON, S. E.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. Nature Immunology, set. 2012.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Research**, v. 25, n. 12, p. 1285–1298, 1 dez. 2015.

HERNÁNDEZ-SANTOS, N. et al. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal Candida albicans infections. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 5, p. 900–910, 19 set. 2013.

HEROLD, S. et al. Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1817–1824, 1 ago. 2006a.

HEROLD, S. et al. Alveolar Epithelial Cells Direct Monocyte Transepithelial Migration upon Influenza Virus Infection: Impact of Chemokines and Adhesion Molecules. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1817–1824, 1 ago. 2006b.

HOENIGL, M. et al. **COVID-19-associated fungal infections**. **Nature Microbiology**Nature Research, 1 ago. 2022.

HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 772–777, 30 abr. 2005.

HOSSEINI, A. et al. Innate and adaptive immune responses against coronavirus.

Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 132, p. 110859, dez. 2020.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. Journal of Medical Virology, v. 93, n. 1, p. 250–256, 30 jan. 2021.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. Alveolar macrophages: Plasticity in a tissue-specific context. Nature Reviews Immunology, fev. 2014.

IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36–49, 23 jan. 2014.

IWATA-YOSHIKAWA, N. et al. TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. **jvi.asm.org 1 Journal of Virology**, v. 93, p. 1815–1833, 2019.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Nature Reviews Molecular Cell BiologyNature Research, 1 jan. 2022.

JOSHI, N.; WALTER, J. M.; MISHARIN, A. V. Alveolar Macrophages. Cellular Immunology, v. 330, p. 86–90, ago. 2018.

KAYAASLAN, B. et al. Characteristics of candidemia in COVID-19 patients; increased incidence, earlier occurrence and higher mortality rates compared to non-COVID-19 patients. **Mycoses**, v. 64, n. 9, p. 1083–1091, 1 set. 2021.

KELLEY, N. et al. **The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 1 jul. 2019. KETELUT-CARNEIRO, N. et al. IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host

Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4507–4517, 1 maio 2015.

KETELUT-CARNEIRO, N. et al. Caspase-11-dependent IL-1α release boosts Th17 immunity against Paracoccidioides brasiliensis. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007990, 19 ago. 2019.

KIM, K. K. et al. Efferocytosis of apoptotic alveolar epithelial cells is sufficient to initiate lung fibrosis. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 11, p. 1056, 17 nov. 2018.

KNOLL, R.; SCHULTZE, J. L.; SCHULTE-SCHREPPING, J. **Monocytes and Macrophages in COVID-19**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 21 jul. 2021. KUMARI, P. et al. Neuroinvasion and Encephalitis Following Intranasal Inoculation of SARS-CoV-2 in K18-hACE2 Mice. 2021.

KURAKADO, S.; KUROGANE, R.; SUGITA, T. 17β-Estradiol inhibits estrogen binding protein-mediated hypha formation in Candida albicans. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 151–155, ago. 2017.

L6CIA, V. et al. A NEW FLUORESCENT VIABILITY TEST FOR FUNGI CELLSMycopathologia. [s.l: s.n.].

LACAZ, C. DA S. Tratado de micologia médica Lacaz. [s.l.] Sarvier, 2002.

LAI, C.-C.; YU, W.-L. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 1, p. 46–53, fev. 2021.

LAMBRECHT, B. N. Alveolar Macrophage in the Driver's Seat. Immunity, abr. 2006. LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature, v. 581, n. 7807, p. 215–220, 14 maio 2020.

LARIONOVA, R. et al. SARS-Cov2 acute and post-active infection in the context of autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Journal of Translational Autoimmunity**, v. 5, 1 jan. 2022.

LAW, H. K. W. et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocytederived human dendritic cells. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2366–2374, 2005a.

LAW, H. K. W. et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus–infected, monocytederived human dendritic cells. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2366–2374, 1 out. 2005b.

LAX, S. F. et al. Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: Results from a prospective, single-center, clinicopathologic case Series. **Annals of Internal Medicine**, v. 173, n. 5, p. 350–361, 1 set. 2020.
LEE, I. T. et al. ACE2 localizes to the respiratory cilia and is not increased by ACE inhibitors or ARBs. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 842–844, 12 jun. 2020.

LIN, D. et al. Co-infections of SARS-CoV-2 with multiple common respiratory pathogens in infected patients. Science China Life SciencesScience in China Press, , 1 abr. 2020.

LIN, K. L. et al. CCR2 ⁺ Monocyte-Derived Dendritic Cells and Exudate Macrophages Produce Influenza-Induced Pulmonary Immune Pathology and Mortality. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2562–2572, 15 fev. 2008.

LUO, X. et al. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. Scandinavian Journal of Immunology, v. 93, n. 3, 25 mar. 2021.

MARFELLA, R. et al. Glycaemic control is associated with SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated patients with type 2 diabetes. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

MARTINEZ, R. EPIDEMIOLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. suppl 19, p. 11–20, set. 2015a. MARTINEZ, R. Epidemiologia da paracoccidioidomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, p. 11–20, 1 set. 2015b.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. Journal of FungiMDPI AG, 1 mar. 2017.

MATTILA, J. T. et al. Simian Immunodeficiency Virus-Induced Changes in T Cell Cytokine Responses in Cynomolgus Macaques with Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection Are Associated with Timing of Reactivation. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 6, p. 3527– 3537, 15 mar. 2011.

MELLMAN, I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. Cancer immunology research, 1 set. 2013.

MONIN, L. et al. Immune requirements for protective Th17 recall responses to Mycobacterium tuberculosis challenge. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 5, p. 1099–1109, 28 set. 2015.

MOSER, D. et al. COVID-19 Impairs Immune Response to Candida albicans. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021a.

MOSER, D. et al. COVID-19 Impairs Immune Response to Candida albicans. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021b.

MULKA, K. R. et al. Progression and Resolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Golden Syrian Hamsters. **American Journal of Pathology**, v. 192, n. 2, p. 195–207, 1 fev. 2022.

NETEA, M. G. et al. Trained Immunity: a Tool for Reducing Susceptibility to and the Severity of SARS-CoV-2 Infection. CellCell Press, , 28 maio 2020a.

NETEA, M. G. et al. **Defining trained immunity and its role in health and disease**. **Nature Reviews Immunology**Nature Research, 1 jun. 2020b.

NIETO-TORRES, J. L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. **Virology**, v. 485, p. 330–339, 1 nov. 2015.

ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: an integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661–674, 17 maio 2013.

PAGÁN, A. J.; RAMAKRISHNAN, L. The Formation and Function of Granulomas. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 639–665, 26 abr. 2018.

PARISE FORTES, M. R. et al. Imunologia da paracoccidioidomicose * Immunology of paracoccidioidomycosisAn Bras Dermatol. [s.l: s.n.].

PARISE FORTES, M. R. et al. **Imunologia da paracoccidioidomicose * Immunology of paracoccidioidomycosisAn Bras Dermatol**. [s.l: s.n.].

PEIRIS, J. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirusassociated SARS pneumonia: a prospective study. **The Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1767– 1772, maio 2003.

PUERTA-ARIAS, J. D.; MEJÍA, S. P.; GONZÁLEZ, Á. The Role of the Interleukin-17 Axis and Neutrophils in the Pathogenesis of Endemic and Systemic Mycoses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 14 dez. 2020.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. [s.l: s.n.].

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 20 maio 2012.

REIZIS, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 37–50, jan. 2019a.

REIZIS, B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. **Immunity**, v. 50, n. 1, p. 37–50, jan. 2019b.

RICHES, D. W. H.; CHAN, E. D.; WINSTON, B. W. TNF-α-induced Regulation and Signalling in Macrophages. **Immunobiology**, v. 195, n. 4–5, p. 477–490, out. 1996.

ROBBINS, S. L. (STANLEY L.; KUMAR, VINAY. Robbins & Cotran : fundamentos de patologia. [s.l.] Elsevier, 2012.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-cov-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 2020.

ROMANI, L. **Immunity to fungal infections**. **Nature Reviews Immunology**European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2004.

ROOS, DI. Chronic granulomatous disease. British Medical BulletinOxford University Press, , 10 jun. 2016.

ROSAS MEJIA, O. et al. Mice infected with Mycobacterium tuberculosis are resistant to acute disease caused by secondary infection with SARS-CoV-2. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 3, p. e1010093, 24 mar. 2022.

RYDYZNSKI MODERBACHER, C. et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996-1012.e19, 12 nov. 2020.

SALIAN, V. S. et al. **COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies**. **Molecular Pharmaceutics**American Chemical Society, , 1 mar. 2021.

SALINA, A. C. et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **eLife**, v. 11, 6 jun. 2022a. SALINA, A. C. G. et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance oapoptotic cells. **eLife**, v. 11, 1 jun. 2022b.

SANCHEZ-CERRILLO. Differential Redistribution of Activated Monocyte and Dendritic Cell Subsets to the Lung Associates with Severity of COVID-19. [s.d.].

SÁNCHEZ-CERRILLO, I. et al. COVID-19 severity associates with pulmonary

redistribution of CD1c+ DCs and inflammatory transitional and nonclassical monocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 12, p. 6290–6300, 26 out. 2020.

SEKINE, T. et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. Cell, v. 183, n. 1, p. 158-168.e14, 1 out. 2020.

SHAH, V. K. et al. **Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection:** Lessons From the Past. Frontiers in ImmunologyFrontiers Media S.A., , 7 ago. 2020. SHANG, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221–224, 14 maio 2020.

SHANKAR, J. et al. Hormones and the Resistance of Women to Paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 296–313, abr. 2011.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. spe, p. e0500001, 16 ago. 2018a.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017. **Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. spe, p. e0500001, 16 ago. 2018b.

SICHIEN, D. et al. IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 626–640, set. 2016.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 1, p. 23–34, mar. 2012.

SNELGROVE, R. J. et al. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 1074–1083, 2008.

SOLIMAN, S. S. M. et al. Mucoricin is a ricin-like toxin that is critical for the pathogenesis of mucormycosis. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 313–326, 1 mar. 2021.

SONG, E. et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. Journal of **Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 1 mar. 2021.

SOUTO, J. T. et al. Chemokine Production and Leukocyte Recruitment to the Lungs of Paracoccidioides brasiliensis-Infected Mice Is Modulated by Interferon- γ . The American Journal of Pathology, v. 163, n. 2, p. 583–590, ago. 2003.

SOUZA, C. O. S. et al. NLRC4 inhibits NLRP3 inflammasome and abrogates effective antifungal CD8+ T cell responses. **iScience**, v. 24, n. 6, 25 jun. 2021.

STEVENS, D. A. The interface of mycology and endocrinology. **Medical Mycology**, v. 27, n. 3, p. 133–140, jan. 1989.

TANG, X. et al. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry. [s.d.].

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nature Reviews ImmunologyNature Research, 1 jun. 2020a.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nature Reviews ImmunologyNature Research, 1 jun. 2020b.

TOTURA, A. L. et al. Toll-like receptor 3 signaling via TRIF contributes to a protective innate immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. **mBio**, v. 6, n. 3, p. 1–14, 26 maio 2015.

TOVO, P.-A. et al. COVID-19 in Children: Expressions of Type I/II/III Interferons, TRIM28, SETDB1, and Endogenous Retroviruses in Mild and Severe Cases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7481, 13 jul. 2021.

TRISTÃO, F. S. M. et al. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma Formation during experimental Paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, p. 949, 21 ago. 2017.

V L CALICH, A. P. C. R. P. A new fluorescent viability test for fungi cells.

Mycopathologia, v. 66, p. 175–177, 28 fev. 1979.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061, 17 mar. 2020a.

WANG, Y. et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. **Journal of Hepatology**, v. 73, n. 4, p. 807–816, out. 2020b.

WEBSTER, B.; ASSIL, S.; DREUX, M. Cell-Cell Sensing of Viral Infection by Plasmacytoid Dendritic Cells. **Journal of Virology**, v. 90, n. 22, p. 10050–10053, 15 nov. 2016.

WOLF, A. J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2509–2519, 15 ago. 2007.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, 1 abr. 2020.

YANG, L. et al. Cardiomyocytes recruit monocytes upon SARS-CoV-2 infection by secreting CCL2. **Stem Cell Reports**, v. 16, n. 9, p. 2274–2288, set. 2021.

ZHANG, Q. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 23 out. 2020.

ZHANG, Y. et al. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent Cryptococcus neoformans H99. **American Journal of Pathology**, v. 175, n. 6, p. 2489–2500, 2009.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020a.

ZHOU, R. et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864- 877.e5, out. 2020b.

ZINGAROPOLI, M. A. et al. Increased sCD163 and sCD14 Plasmatic Levels and Depletion of Peripheral Blood Pro-Inflammatory Monocytes, Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients With Severe COVID-19 Pneumonia. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 26 fev. 2021.

8. ANEXOS

Anexo 1: Sequência de primers

Sequência de primers murinos utilizados nas reações de qPCR

Gene	Sequência sence (5'-3')	Sequência anti-sence (3'-5')
IFN-ბ	ACCTCCACCAGCAGCTCA	CCCCACCTGCTGCATCAG
IFN-β	CCACTTGAAGAGCTATTA	TCCAGGCGTAGCTGTTGACTT
IFN-¥	CATGGCTGTTTCTGGCTGTTAC	CCAGTTCCTCCAGATATCCAAGA
CCL2	CATCCACGTGTTGGCTAC	AACTACAGCTTCTTTGGGACA
CXCL10	ATTTTCTGCCTCATCCTGCT	TGATTTCAAGCTTCCCTATGGC
TNF-ბ	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG	GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
IL-4	GAACGAGGTCACAGGAGAAG	ACCTTGGAAGCCCTACAGA
IL-10	AACAAGGACCAGCTGGACAAC	GCAACCCAAGTAACCCTTAAAGTC
IL-17	TGCCCTCCACAATGAAAAGA	AACACGAAGCAGTTTGGGAC
IL-12	AGCACCAGCTTCTTCATCAGG	GCGCTGGATTCGAACAAAG

Anexo 2: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número 105/2020 sobre o projeto intitulado "Vacina intranasal bivalente utilizando vírus influenza expressando a proteína S (spike) do SARS-CoV-2: mecanismos de proteção e lesão pulmonar", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Santana da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO na data de 21 de fevereiro de 2022.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 105/2020, entitled "Bivalent intranasal vaccine using influenza virus expressing SARS-CoV-2 protein S (spike): protection mechanisms and lung injury", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved in 02/21/2022 by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo.

Ribeirão Preto, 21 de fevereiro de 2022

Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes Coordenador da CEUA/FMRP–USP