

Chamada CNPq Nº 16/2022 Bolsas de Pós-Doutorado

- Dados da Proponente:

Jaqueline de Azevêdo Silva

Professora do Adjunta C1 - Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (2016 – atual);

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética, PPGG, UFPE (Junho/21 – atual);

Coordenadora de Curso de Especialização em Genética e Biologia Molecular Humana, GBMH, UFPE (2017 – Atual)

Graduação em Ciências Biológicas (UPE) – 2006;

Especialização em Biologia Molecular (UPE) - 2008;

Mestrado em Genética (UFPE) – 2010;

Doutorado em Genética (UFPE) – 2012;

Pós-doutorado em Biologia Aplicada à Saúde (LIKA-UFPE) – 2015.

Link para o C. Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9217078285046946>

- Instituição de desenvolvimento do projeto:

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Centro de Biociências - CB

Departamento de Genética

- **Área de Conhecimento Predominante** – Ciências Biológicas;

- **Áreas de Conhecimento Correlatas** - Genética Humana e Médica/ Imunogenética

- **Título da Proposta:** “Estabelecimento de Modelo animal para identificação de vias de ativação gênica da resposta imune e inflamatória na co-infecção *Mycobacterium tuberculosis* e SARS-CoV-2”

- **Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*; SARS-CoV-2; Resposta Imune; Inflamação; COVID-19; Tuberculose; Vitamina D₃.

Introdução

A tuberculose (TB), doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), remonta à Idade da Pedra, mas especificamente no período Paleolítico, cerca de 3,3 milhões de anos atrás. Por volta dos séculos XVIII e XIX, a TB se tornou uma epidemia em continentes como Europa e América do Norte (PEZZELLA, 2019). Até o surto da *Coronavirus Disease-19* (COVID-19), em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) ranqueava a TB como a principal doença causada por um único agente infeccioso, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), e uma das principais causas de mortes no mundo por doenças infecciosas -1,3 milhão em 2020. Sabe-se que mais de 80% das notificações são oriundas de apenas 20 países, dentre eles o Brasil (HUANG *et al.*, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). De dezembro de 2019 até abril de 2022 cerca de 500 milhões de casos foram notificados e mais de 6 milhões de indivíduos foram a óbito devido à doença causada pelo *Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), a COVID-19 (WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2022). A pandemia da COVID-19 se tornou rapidamente um grande problema de saúde pública pelo exponencial espalhamento do vírus no mundo, o que gerou um impacto considerável nas taxas de morbidade e mortalidade, além da desestabilização econômica e social (CARLOS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Dentre os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) em conjunto com a OMS está a erradicação de pandemias como a da TB, o projeto “*End TB*”. Na qual países de todo o mundo se comprometeram em reduzir, até 2030, em 90% a taxa de óbitos e 80% a taxa de incidência da TB em comparação à 2015 (ONU, 2021). De acordo com a ONU, o avanço conquistado até 2019 no combate à TB sofreu um retrocesso com o surto da COVID-19, o que refletiu no aumento no número de óbitos por TB pela primeira vez na última década. Em contrapartida, foi observada a diminuição da sua incidência, acreditando-se ser devido a subnotificação de casos pela baixa testagem (HUANG *et al.*, 2020; ONU, 2021; WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021). TB e COVID-19 afetam principalmente os pulmões, interferem no sistema imune do hospedeiro e apresentam sintomatologia semelhante. As principais manifestações clínicas são febre, sintomas respiratórios, fadiga e sintomas gastrointestinais (LIN *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020), sendo o principal sintoma em comum a tosse prolongada. Outros sintomas da TB são hemoptise, dispneia, suor noturno, perda de apetite e de peso (WEI *et al.*, 2020). O *Mtb* infecta primariamente os pulmões (TB pulmonar), entretanto pode afetar outros órgãos e tecidos como intestinos, fígado, linfonodos, pele, cérebro, músculos esqueléticos e sistema reprodutor (TB extrapulmonar) (MATHIASSEN *et al.*, 2020). O *Mtb* é um dos patógenos mais adaptados para escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro e, eventualmente, estabelecer a infecção (SADYKOV *et al.*, 2020). Estima-se que um quarto da população mundial apresenta TB latente (2 bilhões de indivíduos), dos quais apenas 5-15% dos indivíduos infectados evoluem para a condição ativa da doença (MOUSQUER; PERES; FIEGENBAUM, 2021). Fatores genéticos e ambientais desempenham um papel crucial na patogenicidade da TB, sendo responsável pela susceptibilidade no indivíduo infectado (ARAVINDAN, 2019). Assim como na forma grave da COVID-19, a probabilidade de desenvolver a TB doença torna-se muito

maior entre os pacientes com sistema imune comprometido ou fatores de risco como desnutrição, diabetes, tabagismo, alcoolismo, situação de rua, população carcerária e indígenas (MATHEMA *et al.*, 2017; MENON *et al.*, 2016; MOUSQUER; PERES; FIEGENBAUM, 2021; WORLD HEALTHY ORGANIZATION, 2021). Na China, um dos principais países com maior incidência da TB e local da origem do surto da COVID-19, um estudo analisou a gravidade dos sintomas de COVID-19 em indivíduos com infecção latente por TB (ILTB) e em pacientes com TB ativa. Os pesquisadores verificaram uma maior frequência de sintomas graves da COVID-19 em pessoas com ILTB (36% dos casos), mesmo em comparação a pacientes com diabetes (25%), hipertensão (22%), doença cardíaca coronária (8%) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC - 5%). Dentre os pacientes com TB ativa, 78% apresentaram sintomas graves da COVID-19 (LIU, YONGYU *et al.*, 2020). Os indivíduos com ILTB positivos para o SARS-CoV-2 exibiram uma resposta imune inata mais exacerbada com níveis elevados de citocinas inflamatórias em comparação com indivíduos com ILTB sem COVID-19 (KUDAY, 2020). Nesses indivíduos coinfectados (*Mtb* + SARS-CoV-2), observou-se a diminuição das células TCD4+ e TCD8+, aumento da excreção viral durante a expectoração e níveis indetectáveis ou anormalmente baixos de anticorpos após a recuperação (LIU, YONGYU *et al.*, 2020). Tais fatores traduzem uma condição patológica com sintomatologia mais grave e um maior potencial de disseminação viral (CRISAN-DABIJA *et al.*, 2020). A conexão entre o *Mtb* e o SARS-CoV-2 provavelmente é bidirecional. A imunossupressão temporária induzida pela TB pode aumentar a susceptibilidade dos pacientes à COVID-19, que por sua vez, também aumentará a susceptibilidade à TB ativa, no entanto as vias pelo qual essa correlação se mantém existente ainda é desconhecida (UDWADIA *et al.*, 2020). A ILTB se dá pela competência da resposta imune do hospedeiro em conter a propagação da infecção por meio da criação de granulomas, se tornando o foco da resposta imune anti*Mtb*. Diversas células do sistema imune participam desse processo, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CDs), células natural killer (NK), mastócitos e linfócitos. O tratamento correto e a resposta imune eficaz contribuem à eliminação do *Mtb* e resolução de granulomas; no entanto, algumas características dos pacientes podem predispor-los aos processos crônicos – TB doença (STARSHINOVA *et al.*, 2022). O SARS-CoV-2 exerce uma influência significativa no sistema imunológico do hospedeiro, resultando em uma imunossupressão grave, o que pode desencadear a ativação e progressão da ILTB existente na forma ativa da doença (LIN *et al.*, 2020). Atualmente, sabe-se que o SARS-CoV-2 penetra através da membrana mucosa do trato respiratório superior e se replica nas células do epitélio ciliado, com o desenvolvimento de viremia secundária, distúrbios imunológicos, hipóxia e disseminação para os órgãos-alvo como coração, fígado e rins, o que leva à microangiopatia na forma de trombo, vasculite produtiva e síndrome de hipercoagulação com danos ao sistema imune (OCHANI *et al.*, 2021). O efeito citotóxico direto do SARS-CoV-2 é devido à penetração do vírus em células que expressam a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que facilita a entrada no vírus nas células-alvo por meio da ligação à proteína S. Os interferons do tipo I (IFN-I) estimulam a expressão dos receptores de entrada do SARS-CoV-2 e permitem que o vírus seja endocitado (YANG; WANG, 2020). O vírus infecta e se replica em células ciliadas e secretoras de muco do epitélio

brônquico, pneumócitos tipo II nos pulmões e macrófagos (ABASSI *et al.*, 2020; MASON, 2020). Assim como o *SARS-CoV-2*, o *Mtb* também infecta pneumócitos tipo II nos pulmões via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células hospedeiras como receptores do tipo toll (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do complemento (CRs), moléculas de adesão intercelular específica da célula dendrítica que agarram a *non integrina* (DC-SIGN), receptores de manose, receptores CD14, receptores de eliminação e receptores FC γ (HOSSAIN; NORAZMI, 2013). Além disso, o *Mtb* é fagocitado pelos macrófagos alveolares e posteriormente translocado para os lisossomos – ativação fagolisossomo, para sua destruição (DE ALBUQUERQUE BORBOREMA *et al.*, 2020). A coinfeção de *SARS-CoV-2* e *Mtb* pode piorar o quadro desencadeado por cada patógeno. Sendo a coinfeção em macrófagos responsável pelo aumento da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Infecção de pneumócitos tipo II com o *SARS-CoV-2* pode causar falha de regeneração das células e levar a lesões nos pulmões, danos brônquicos acelerados e, finalmente, a doença pulmonar (PINKY; GONZÁLEZ-PARRA; DOBROVOLNY, 2019). Na COVID-19 observa-se um grande infiltrado inflamatório de células imunes nos pulmões, que, em adição ao dano gerado pela própria infecção viral, contribui para maior dano tecidual devido à secreção em excesso de proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS) (STARSHINOVA *et al.*, 2022). Em pacientes com sintomas graves de COVID-19 é frequentemente observada linfopenia associada a uma diminuição acentuada no conteúdo absoluto de células T CD4+, T CD8+, células B e células NK (ROSSATO SILVA1 *et al.*, 2021). Enquanto que a contagem de CD3+ é inversamente relacionada com as concentrações de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6), IL-10 e o fator de necrose tumoral - α (TNF- α) em amostras de sangue total periférico (RAMIREZ; SANCHEZ; PIRSKANEN, 2021). Neutrófilos são a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias tanto na infecção pelo *SARS-CoV-2*, como na pelo *Mtb* (SETTE; CROTTY, 2021). Essas células estão ativamente envolvidas na eliminação do patógeno nos estágios iniciais de sua invasão, mas em contrapartida geram danos ao próprio organismo pela destruição do tecido pulmonar e posterior fibrose (SMITH, 2003). Quando a resposta imune adaptativa desempenhada pelas células T é prejudicada, o processo infeccioso será mais danoso ao hospedeiro. A resposta T auxiliar do tipo 1 (Th1) ativa a produção de interferon- γ (IFN- γ) e TNF- α , que contribuem para a ativação da proteção antimicrobiana pelo recrutamento de macrófagos, enquanto que a ativação da resposta Th17 e neutrófilos recrutados oriundos do sangue periférico promovem além dos efeitos protetores, dano aos tecidos circundantes (ROSSATO SILVA1 *et al.*, 2021). Tanto na infecção pelo *Mtb* quanto pelo *SARS-CoV-2*, as células Th1 são consideradas as principais células T auxiliares efetoras. Após o processo de reconhecimento de antígenos nos tecidos periféricos, essas células produzem IFN- γ , que recrutam e ativam uma ampla gama de células imunocompetentes, incluindo células T citotóxicas CD8+, macrófagos e células B envolvidas na eliminação de patógenos intracelulares. Na TB também observa-se um aumento de células Th2 e uma diminuição de células Th17 (STARSHINOVA *et al.*, 2022). Entre os pacientes com COVID-19, um aumento na proporção de células Th2 em circulação foi associado a um prognóstico ruim, enquanto que não foram encontradas diferenças significativas nas células Th1 ou Th17 (GIL-ETAYO *et al.*, 2021). A secreção de IFN- γ por linfócitos Th17 afetam

negativamente o desenvolvimento de uma proteção imune a longo prazo contra o *Mtb* em experimentos em modelo animal com sucessivas infecções. Hipotetiza-se que maior resposta Th1 e menor influência Th17 contribui para o desenvolvimento de uma resposta imune mais eficaz à invasão do *Mtb* (MONIN *et al.*, 2015). Na tuberculose, a imunidade adaptativa desempenha papel principal na resposta imune, realizada principalmente por linfócitos T (RAMIREZ; SANCHEZ; PIRSKANEN, 2021). Com a infecção do SARS-CoV-2, ocorre a depleção de células T e uma diminuição na diversidade funcional dessas células (CAÑAS, 2020). De acordo com vários estudos, o SARS-CoV-2 foi encontrado em linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, o que pode também prejudicar sua função (ZHENG *et al.*, 2020). Portanto, hipotetiza-se que a infecção pelo coronavírus, contra a qual a imunidade celular é ativada, leva ao esgotamento do sistema destinado a combater a infecção pelo *Mtb*. Por fim, acredita-se que o quadro de ILTB contribui para danos nos pulmões e para supressão imunológica geral, que é piorada pelo SARS-CoV-2 e predispõe ao desenvolvimento da TB doença com ou sem resistência a drogas. Por outro lado, a imunossupressão latente pode ser um fator de defesa contra o desenvolvimento da tempestade de citocinas (STARSHINOVA *et al.*, 2022). O sistema imunológico do hospedeiro responde ao SARS-CoV-2 também pela indução da diferenciação de monócitos em macrófagos pró-inflamatórios pela ativação das vias JAK-STAT, mediada pela produção de IL-1 β e/ou IL-18 (MERAD; MARTIN, 2020). Essa ativação pode levar à produção de citocinas pró-inflamatórias e resultar na tempestade de citocinas associada à COVID-19. Tempestade de citocinas causa replicação rápida do SARS-CoV-2 e resulta na infecção de mais células epiteliais alveolares (COPERCHINI *et al.*, 2020). O aumento significativo de citocinas como IL-6 e IL-1 β recrutam uma maior quantidade de neutrófilos, que infiltram o tecido pulmonar e causam lesão pulmonar (XIE *et al.*, 2020). A tempestade de citocinas também é induzida na infecção pelo *Mtb* e é impulsionada por uma resposta imune avassaladora de macrófagos alveolares, monócitos e CDs nos pulmões e linfonodos (ETNA *et al.*, 2014). Essas células liberam uma série de citocinas, incluindo IL-1, IL-18, IFN- α , IL-6, IL-10 e, portanto, coinfeções de SARS-CoV-2 + *Mtb* provavelmente resultam na produção de grandes quantidades de citocinas e levam a uma patogenicidade exacerbada (FLESCHE; KAUFMANN, 1993; TAPELA; OCHIENG' OLWAL; QUAYE, 2020). Embora ambos os patógenos compartilhem características da tempestade de citocinas, é importante notar que a magnitude da resposta difere, sendo a resposta ao *Mtb* menos intensa. Além disso, os resultados associados à tempestade de citocinas são diferentes para as duas infecções. Pacientes com COVID-19 apresentam síndrome do desconforto respiratório agudo, enquanto que na TB o desgaste crônico e a longa destruição lenta resultam da tempestade de citocinas (TAPELA; OCHIENG' OLWAL; QUAYE, 2020). Os *Mycobacterium spp* expressam várias proteínas homólogas aos antígenos do SARS-CoV-2, levantando a possibilidade de que respostas imunes adaptativas ao *Mtb* podem conferir imunidade heteróloga contra o SARS-CoV-2 (DAKAL, 2021; EGGENHUIZEN *et al.*, 2021; NUOVO *et al.*, 2020). Em estudo realizado com pacientes com TB e COVID-19 nos quais foram injetadas proteínas do *Mtb* e do SARS-CoV-2 verificou-se que a coinfeção limita a capacidade de resposta ao SARS-CoV-2 *in vitro*, enquanto que a resposta específica ao *Mtb* não foi prejudicada. Os autores explicaram os resultados obtidos como a resposta imune se concentrando na infecção pelo

Mtb, o que enfraqueceria a resposta ao *SARS-CoV-2* (LIU, WANG-DA *et al.*, 2022). No Brasil (e no mundo), dados consistentes sobre as vias genéticas e imunológicas ativadas pelo hospedeiro em uma coinfeção *Mtb* + *SARS-CoV-2*, são muito limitados, principalmente porque a presença da ILTB é subnotificada. A regulação da inflamação é um fator crítico que determina o resultado dessas infecções. A inflamação excessiva tanto na TB, como na COVID-19, prejudica a imunidade celular, danifica o tecido pulmonar e pode levar à quadros mais graves dessas doenças. Por outro lado, a inflamação diminuída pode prejudicar o controle das infecções ao retardar a indução da imunidade inata e adaptativa (NOVIKOV *et al.*, 2011). Esse balanceamento da resposta imune frente à inflamação é crucial para um desfecho clínico favorável ao hospedeiro, sabendo disso, novos papéis atribuídos a hormônios esteróides têm sido elucidados, desde sua atuação imunomoduladora até seu papel na inibição direta de microrganismos (LANG; ASPINALL, 2017). Dentre esses hormônios se destaca a vitamina D3 (VD₃). Este hormônio pode vir a afetar a infecção por esses patógenos por diversos mecanismos de defesa imunológica, sendo importante alvo de estudo na contenção desses patógenos. Embora a coinfeção *Mtb* + *SARS-CoV-2* represente enorme desafio de saúde, especialmente em países onde as vacinas contra a COVID-19 e a TB são escassas, não se sabe ao certo qual o efeito da infecção por *Mtb* nas respostas do hospedeiro ao *SARS-CoV-2* e vice e versa, pelos poucos relatos clínicos desta coinfeção na ausência de outras comorbidades (RIOU *et al.*, 2021; TAMUZI *et al.*, 2020). Para entender como, na ausência de outras comorbidades, a coinfeção desses patógenos interfere no curso das doenças por eles desencadeadas, a utilização de um modelo animal deve auxiliar na compreensão da patogênese destas doenças e de possíveis vias de alvo terapêutico para ambas. Desta forma, o desenvolvimento de estudos para identificação das vias genéticas de ativação de respostas imunológicas ativadas na coinfeção da *SARS-CoV-2* + *Mtb* em modelo animal, podem gerar informações importantes sobre as diferenças na resposta imune na COVID-19, principalmente, mas não exclusivamente, em indivíduos fora dos grupos de risco para doença. Além disso, os dados gerados podem contribuir para novas perspectivas de reposicionamento de drogas e tratamentos.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; *SARS-CoV-2*; Resposta Imune; Inflamação; COVID-19; Tuberculose; Vitamina D₃.

a) **Objetivos**

- Geral:

Estabelecer um modelo animal para investigar as principais vias de ativação gênica relacionadas à resposta imune e à inflamação frente à coinfeção *Mtb* e *SARS-CoV-2*.

- Específicos:

<u>Objetivo Específico</u>	<u>Meta</u>
I. Estabelecer um modelo animal para coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;	Identificar e estabelecer um modelo animal mais eficiente para suportar e responder à coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;
II. Induzir a coinfeção por <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> para avaliação de transcriptoma;	Avaliar as vias gênicas influenciadas pela coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> após identificação de melhor tempo de análise pós-infecção.
III. Identificar as vias de ativação gênica influenciadas na coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;	Analisar por bioinformática as vias de regulação da expressão gênica ativadas ou inibidas antes (controle) e após na coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;
IV. Validar os genes diferencialmente expressos na coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e do <i>Mtb</i> ;	Testar por técnica de qPCR se os genes identificados na análise de transcriptômica são confirmados como diferencialmente expressos;
V. Definir o perfil de expressão de genes da inflamação durante a coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;	Realizar a análise da expressão de genes da inflamação em animais antes da infecção e coinfectados com <i>Mtb</i> e <i>SARS-CoV-2</i> ;
VI. Testar a eficiência de drogas anti micobacterianas em modelo animal de infecção individual e coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;	Avaliar se as principais drogas anti <i>Mtb</i> Rifampicina, Isoniazida e Etambutol tem ação/influência na resposta imune e inflamatória no processo de coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> .
VII. Testar a influência da VD ₃ como adjuvante terapêutico na coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> e a sua ação na resposta imune e inflamatória em modelo animal.	Verificar a ação do hormônio esteroide VD ₃ na coinfeção do <i>Mtb</i> e <i>SARS-CoV-2</i> em modelo animal na presença e ausência do tratamento com as drogas anti <i>Mtb</i> na modulação da expressão de genes da inflamação e da resposta imune e no perfil de citocinas.
VIII. Identificar o perfil de proteínas expressas nos processos de infecção individual e coinfeção <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> ;	Identificar e dosar as proteínas em plasma, focando nas principais citocinas pró e anti-inflamatórias expressas em modelo animal de infecção individual e coinfeção do <i>SARS-CoV-2</i> e <i>Mtb</i> .

b) Metodologia

- Local do estudo, tipo e considerações éticas

O projeto de pesquisa será desenvolvido em parceria com o Departamento de Virologia e Laboratório de Imunoparasitologia, ambos do Instituto Aggeu Magalhães quanto à caracterização e doação das cepas dos patógenos *Mycobacterium tuberculosis* e *SARS-CoV-2*. Os experimentos serão realizados no laboratório de biossegurança nível 3 (NB3) com biotério, adequado para manipulação de animais infectados com microrganismos do grupo de risco classe III. A UFPE conta com o laboratório nível NB3 com biotério no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit SG), recentemente inaugurado e ainda no Aggeu Magalhães contamos com a mesma estrutura para desenvolvimento dos modelos animais.

O estudo realizado será do tipo quantitativo, analítico e experimental em laboratório. O presente projeto de pesquisa será submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) de acordo com a Regulamentação do CONCEA/MCTI.

- Desenho do estudo

Fase : Estabelecimento de modelo animal seguro e eficaz para coinfeção Mtb e SARS-CoV-2 - Objetivos específicos I a V

- ***Objetivo I: Identificação do modelo animal mais seguro e eficiente***

- Camundongos

Os animais testados inicialmente no estudo serão camundongos K18-hACE2 C57BL/6J hemizigótico (cepa: 2B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J) a serem adquiridos no *The Jackson Laboratory* (BarHarbour, ME). Camundongos transgênicos K18-hACE2 expressam o gene *ACE2* humano, o receptor usado pelo *SARS-CoV-2* para entrar nas células. O promotor da queratina 18 humana direciona a expressão para o epitélio, incluindo o epitélio das vias aéreas, onde as infecções normalmente começam. Sendo assim muito úteis para estudar a patogênese da COVID-19 assim como possíveis vias de alvos terapêuticos. Esses camundongos serão manuseados de maneira consistente com as diretrizes do CDC/ABSA/OMS para prevenção de infecção humana pelo vírus SARS-CoV-2. EPI adequado e métodos de manuseio serão usados em todos os momentos ao trabalhar com esses camundongos. Todos os ratos serão alojados em grupos de 5 ratos por gaiola, a menos que seja necessário de outra forma para fins de monitoramento e receberão enriquecimento ambiental. Comida e água serão fornecidas *ad libitum*.

- Cultura de *Mycobacterium tuberculosis*

O isolado do *Mtb* utilizado para infecção dos animais será cedido pela pesquisadora Dr.^a Michelle Rabello do Departamento de Imunologia do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FioCruz. A cepa utilizada *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (UFPEDA 82) será cultivada em meio Proskauer Beck contendo 0,05% de tiloxapol até a fase mid-log e, incubadora de CO₂ a 37°C. As bactérias serão congeladas em alíquotas de 1 ml a -80°C até serem utilizadas para a infecção dos animais. O título de bactérias vivas será determinado por meio da contagem de placas após diluição seriada e semeio em placas com meio ágar 7H11. As colônias de *Mtb* terão sua autenticação confirmada por observação da morfologia.

- Cultura de SARS-CoV-2

A cepa de SARS-CoV-2 adaptada a camundongo (MA10) a ser utilizada para infecção dos animais será cedida pelo pesquisador Dr. Lindomar Pena do Departamento de Virologia do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – FioCruz. O vírus será cultivado, preparado e autenticado conforme estabelecido na literatura (BEDNASH *et al.*, 2022). Ou seja, para estabelecer os estoques virais a serem utilizados nesse projeto, uma alíquota do vírus será diluída 1:10.000 em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) incompleto (Gibco suplementado com 4,5 g/L de D-glicose, 110 mg/L de piruvato de sódio) e adicionado ao confluente de Células VeroE6 (ATCC). As células serão incubadas com o vírus por 1h (37°C, 5% CO₂), em seguida o meio será substituído por DMEM completo (4% de soro fetal bovino inativado pelo calor) e as células serão incubadas por 3 dias (37°C, 5% CO₂) para permitir a propagação do vírus. Após esse período, inspeção visual sob microscopia deverá demonstrar a morte das células VeroE6 infectadas. O sobrenadante será coletado, centrifugado em baixa velocidade para remover os restos celulares e posteriormente alíquotado, congelados e armazenados a -80°C. Essas alíquotas congeladas servirão como estoque para a infecção. O título de vírus vivo das alíquotas congeladas será determinado via ensaio de crescimento de placa conforme descrito abaixo.

- Ensaio de contagem de placas de SARS-CoV-2

Uma versão modificada do ensaio de placa desenvolvido pelo laboratório Diamond será utilizada para determinar cargas virais pulmonares em animais desafiados (CASE *et al.*, 2020). Um dia antes do início do ensaio, 12 poços com células VeroE6 serão semeadas com o vírus e incubadas durante a noite (37°C, 5% CO₂). No dia do ensaio serão preparadas diluições em série de material contendo vírus (por exemplo, homogenato

de pulmão) em DMEM e aquecido a 37°C. O meio de cada poço da placa de 12 poços deverá ser removido suavemente via pipetagem e substituído por 500µL de cada diluição da amostra de vírus. A placa será incubada por 1 hora (37°C e 5% CO₂). Durante este período de incubação, uma solução compreendendo DMEM e 2% de metilcelulose será feita e aquecida a 37°C em banho-maria. Após o período de incubação de 1 hora, o sobrenadante deverá ser removido de cada poço e substituído por 1 mL do DMEM: metilcelulose pré-aquecido. A placa de cultura voltará à incubadora onde permanecerá em repouso por 3 dias. No último dia, a mistura de DMEM: metilcelulose será removida de cada poço, as células serão fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (20 minutos, temperatura ambiente), lavadas com PBS e coradas com 0,05% de cristal violeta (em 20% de metanol). Após enxaguar as placas com água destilada, as placas após secagem serão contadas sob um microscópio.

- Infecção por aerossol de *Mtb*

Os camundongos deverão ser infectados por aerossol com a cepa *Mtb H37Rv* usando o Sistema de Exposição de Aerossóis Glas-Col (MILLER; ROBINSON, 2012) com alta carga bacteriana de aproximadamente 500 unidades formadoras de colônia (UFC). Para as determinações da carga pós infecção bacteriana, os pulmões, baço e fígado serão assepticamente removidos após sacrifício dos animais com overdose de anestésico (isoflurano). Os órgãos serão homogeneizados individualmente em soro fisiológico normal estéril (sistema Gentle Macs, programa “RNA” run 2X). Diluições seriadas de cada órgão serão plaqueadas em meio ágar 7H11 e as colônias contadas após 2–3 semanas de incubação a 37°C e 5% CO₂. Pulmões de camundongos controle serão plaqueados no 1º dia pós-infecção para verificar a entrega de ~500 *Mtb* UFC.

- Infecção do SARS-CoV-2 por desafio intranasal

Os camundongos a serem infectados pelo SARS-CoV-2 serão desafiados com o SARS-CoV-2. No momento do desafio, os camundongos serão anestesiados com isoflurano, pesados e mantidos em posição semi-supina enquanto 50 µL de PBS contendo o vírus ($2,5 \times 10^4$ PFU) será administrado via intranasal (*i.n.*) por instilação. Camundongos controle receberam o mesmo volume de PBS estéril, usando a mesma anestesia e em protocolo de instilação. Após instilação, cada camundongo será devolvido à sua respectiva gaiola e monitorado diariamente para alterações de peso, condição corporal e comportamento. Para determinações de carga viral, os pulmões dos animais desafiados serão removidos assepticamente após sacrifício dos animais com overdose de

anestésico (isoflurano). O tecido será homogeneizado individualmente, diluições em série serão usadas no ensaio para contagem de placas.

- **Objetivo II: Induzir a coinfeção e análises de expressão gênica global**

Para determinar se as respostas do hospedeiro ao *SARS-CoV-2* são afetadas pela infecção por *Mtb*, e vice e versa, camundongos K18-hACE2 serão infectados com *Mtb* por aerossol. Após trinta dias de infecção, os camundongos serão desafiados com o *SARS-CoV-2*, via intranasal (figura 1). Os camundongos coinfectados com *Mtb*⁺/*SARS-CoV-2*⁺ serão monitorados diariamente para alterações no peso e de comportamento, assim como os três grupos de controle: camundongos que serão infectados por *Mtb* ao mesmo tempo (Dia -30), mas desafiados com *Phosphate-Buffered Saline* 1x (PBS) estéril (*Mtb*⁺/*SARS-CoV-2*⁻); camundongos que não serão infectados com *Mtb*, mas serão desafiados com *SARS-CoV-2* (*Mtb*⁻/*SARS-CoV-2*⁺); e camundongos que não serão infectados pelo *Mtb* e serão desafiados com PBS estéril (*Mtb*⁻/*SARS-CoV-2*⁻). Após o desafio, os grupos de camundongos serão submetidos a coleta de sangue e sacrifício nos dias 4, 7 e 14. Os pulmões e outros tecidos serão removidos para avaliar as cargas de *Mtb* e *SARS-CoV-2*, bem como uma série de outros testes e leituras (análise de expressão gênica e dosagem de citocinas) (figura 1). Todos os camundongos serão alojados de forma idêntica durante todo o experimento (ROSAS MEJIA *et al.*, 2022). Após essa fase, os animais serão sacrificados para avaliação de órgãos e sangue total que serão processados para extração de RNA total para análises de transcriptoma.

- **Objetivo III: Identificar as vias de ativação gênica influenciadas na coinfeção *SARS-CoV-2* e *Mtb***

A síntese de cDNA a partir dos RNAs obtidos das amostras será realizada através da metodologia Sequence-Independent Single-Primer Amplification (SISPA), como previamente descrito por LEWANDOWSKI *et al.* (2020). O cDNA amplificado será purificado utilizando o kit AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA) e quantificado através do Kit Qubit high-sensitivity double-stranded DNA (dsDNA) kit (Thermo Fisher), ambos seguindo as instruções do fabricante (ZHOU *et al.*, 2020). As bibliotecas genômicas obtidas dos produtos de PCR serão purificadas utilizando o Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, EUA) e quantificadas com o Kit Qubit high-sensitivity double-stranded DNA (dsDNA) kit (Thermo Fisher). As bibliotecas serão sequenciadas no formato paired-end na plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, EUA) usando o kit MiSeq Reagent Kit V3 600 (Illumina, San Diego, EUA)

em uma máquina Illumina MiSeq com complementação de sequenciamento Sanger utilizando um sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA).

- Montagem e anotação

Os reads brutos serão verificados pelo software FastQC (ANDREWS, 2010). Em seguida, caso haja presença de adaptadores, utilizaremos o CutAdapt (MARTIN, 2011) para remoção dos mesmos. A filtragem dos reads será realizada pelo software Sickle (JOSHI; FASS, 2011), os valores de filtragem de tamanho e qualidade serão de 20 para ambos. Para montagem dos genomas utilizaremos o Spades (BANKEVICH et al., 2012) e o pipeline do Unicycler (WICK et al., 2017) e para uma precisa identificação dos isolados faremos uma análise de identidade nucleotídica (ANI), pelo pyani (PRITCHARD, 2016) utilizando os genomas montados com outros genomas disponíveis nos bancos de dados públicos.

- Extração de RNA humano e sequenciamento do RNA total

Para o sequenciamento completo do RNA (RNAseq), não é necessário a anotação prévia da espécie para que haja a detecção de transcritos conhecidos ou novos, incluindo variantes raras. O RNA total das amostras será extraído de um pool de amostras de pacientes com COVID-19 e controles expostos não infectados usando a metodologia do Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Para o sequenciamento usaremos RNA total e o kit comercial stranded total RNA TruSeq (Illumina, San Diego, EUA), com capacidade de leitura de 55M, e seguindo às recomendações do fabricante para remoção de RNA ribossomal, síntese de cDNA, marcação das sequências e sequenciamento.

- Análise dos Dados

No sequenciamento global do RNA, as análises serão realizadas através da plataforma Galaxy. Para as análises para os estudos de expressão gênica usarão o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Cada ensaio será realizado em triplicata técnica, e os resultados serão apresentados como médias \pm desvio padrão. A análise estatística será realizada através do software GraphPad Prism® versão 5.0 considerando como significante valores com $p < 0.05$ e intervalo de confiança de 95%. Os resultados serão comparados por análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparação múltipla de Dunn e do teste T de Student.

- Inteligência Artificial

A inteligência artificial (IA) tem o potencial de alterar a medicina [Rajpurkar et al., 2022]. Neste trabalho serão utilizados modelos de aprendizado profundo [LeCun et

al., 2015] para determinar se podemos prever, através dos dados de expressão gênica global, após a coinfeção *SARS-CoV-2* e *Mtb* a probabilidade de desfechos desfavoráveis. Após a produção e análise dos dados gerados poderemos determinar a melhor forma de análise usando IA.

- **Objetivo IV e V: Validar os genes diferencialmente expressos e definir o perfil de expressão de genes da inflamação durante a coinfeção SARS-CoV-2 e Mtb**
- Extração de RNA total, síntese de cDNA e ensaios de expressão gênica

O RNA será isolado a partir de amostras de sangue total periférico e de amostra de tecido pulmonar dos animais utilizados no estudo. O RNA da amostra de sangue será extraído usando o reagente TRIzol® e seguindo as instruções do fabricante. O RNA do tecido pulmonar será extraído com o kit RNeasy Mini Kit method (Qiagen), também seguindo as recomendações do fabricante. As amostras deverão permanecer armazenadas a -80°C até serem utilizadas para síntese de cDNA.

A concentração padrão de RNA total para síntese de cDNA utilizada é de 500ng. O cDNA será sintetizado usando o kit comercial *GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)*, da Promega, seguindo as instruções do fabricante. A amostra será diluída em 80µL de água e armazenada em freezer a -20°C.

Os ensaios de expressão gênica seguirão de acordo com as normas de padronização propostas por Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Serão usadas sondas fluorogênicas específicas do tipo Taqman (Thermo Fisher Scientific), para os genes alvo. A reação inicia-se aplicando-se 2µL da amostra de cDNA em placa/tubo óptico, mais 6µL de água ultrapura, 6µL de TaqMan® Master Mix universal (Thermo Scientific) e 0,6µL de sonda de expressão TaqMan® para cada um dos genes alvo.

Vale indicar que precisarão ser definidos genes de referência para cada amostra (sangue total e tecido pulmonar). Para isso serão testados os seguintes genes: *90 kDa heat shock protein (HSP90)*, *Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 (RPLP0)*, *Beta-2-Microglobulin (B2M)*, *Actin beta (ACTB)*, *glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6-PD)*, *Elongation factor 1-alpha (EF1A)*, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* e *Hypoxanthine Phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1)*. Caso os genes não sejam adequados ampliaremos o número de candidatos. Todos os ensaios de quantificação relativa serão realizados no equipamento ABI7500 (Applied Biosystems). Cada duplicata biológica será realizada em triplicata técnica. A análise de expressão relativa será realizada pelo método $\Delta\Delta Cq$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Fase 2: : Avaliação da influência de drogas antiMtb e adjuvantes terapêuticos na resposta imune e inflamatória contra o SARS-CoV-2 na coinfeção com o Mtb em modelo animal

- Objetivo VI: Testar a eficiência de drogas anti micobacterianas em modelo animal de infecção individual e coinfeção SARS-CoV-2 e Mtb

- Teste com drogas anti micobacterianas

Os camundongos que serão submetidos ao tratamento receberão as drogas antiMtb Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH) e Etambutol (ETB) – terapia RIE. As mesmas serão administradas 5 dias por semana via oral (gavagem) em sua dose farmacocinética equivalente humana (0,2mL por camundongo): RIF: 10 mg/kg, INH: 25 mg/kg, ETB: 100 mg /kg.

- Teste de eficiência das drogas

Para avaliar se drogas antiMtb influenciam na resposta ao SARS-CoV-2 na coinfeção ou não ao Mtb, camundongos K18-hACE2 serão infectados com Mtb por aerossol. Após quinze dias de infecção, os camundongos serão divididos em dois subgrupos: camundongos tratados com Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH) e Etambutol (ETB) - terapia RIE; e camundongos não tratados. Após 15 dias do início do tratamento, os dois grupos de camundongos serão desafiados com o SARS-CoV-2, via intranasal (figura 2). Os camundongos serão monitorados diariamente para alterações no peso e de comportamento, assim como os três grupos de controle: camundongos que serão infectados por Mtb ao mesmo tempo (Dia -30), tratados com as drogas antiMtb, mas desafiados com PBS estéril ($Mtb^+/SARS-CoV-2^- + RIE^+$); camundongos que não serão infectados com Mtb, mas serão desafiados com SARS-CoV-2 ($Mtb^+/SARS-CoV-2^+ + RIE^+$); e camundongos que não serão infectados pelo Mtb e serão desafiados com PBS estéril ($Mtb^-/SARS-CoV-2^- + RIE^+$). Após o desafio, os grupos de camundongos serão submetidos a coleta de sangue e sacrifício nos dias 4, 7 e 14. Os pulmões e outros tecidos serão removidos para avaliar as cargas de Mtb e SARS-CoV-2, bem como uma série de outros testes e leituras (análise de expressão gênica e dosagem de citocinas) (figura 2). Todos os camundongos serão alojados de forma idêntica durante todo o experimento.

- Objetivo VII: Testar a influência da VD₃ na como adjuvante terapêutico na coinfeção SARS-CoV-2 e Mtb e a sua ação na resposta imune e inflamatória em modelo animal.

- Suplementação com Vitamina D₃

Os animais serão submetidos a suplementação de VD₃ via oral (gavagem). A suplementação será realizada na concentração de 20,000 UI/kg direta na dieta.

- Identificação de ação do adjuvante Vitamina D₃

Para verificar a ação imunomoduladora da vitamina D₃ (VD₃) na resposta ao SARS-CoV-2 e ao *Mtb* na coinfeção ou não, camundongos K18-hACE2 serão infectados com *Mtb* por aerossol. Após quinze dias de infecção, os camundongos serão divididos em dois subgrupos: camundongos tratados com Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH) e Etambutol (ETB) (RIE) e suplementação de VD₃; e camundongos não tratados com as drogas anti*Mtb*, mas suplementados com VD₃. A dosagem da VD₃ será ajustada de acordo com o peso do animal (EL-FAWAL; EL FAYOUMI; MAHMOUD, 2018) (Fawal et al. 2018). Após 15 dias do início do tratamento, os dois grupos de camundongos serão desafiados com o SARS-CoV-2, via intranasal. Os camundongos serão monitorados diariamente para alterações no peso e de comportamento, assim como os quatro grupos de controle: camundongos que serão infectados por *Mtb* ao mesmo tempo (Dia -30), tratados com as drogas anti*Mtb* e VD₃, mas desafiados com PBS estéril (*Mtb*⁺/SARS-CoV-2⁻ + RIE⁺ + VD₃⁺); camundongos infectados com *Mtb* não tratados ou suplementados e desafiados com PBS estéril (*Mtb*⁺/SARS-CoV-2⁻ + VD₃⁺); camundongos infectados com *Mtb* e desafiados com SARS-CoV-2 (*Mtb*⁺/SARS-CoV-2⁺); e camundongos que não serão infectados pelo *Mtb* e serão desafiados com SARS-CoV-2 e suplementados com VD₃ (*Mtb*⁻/SARS-CoV-2⁺ + VD₃⁺). Após o desafio, os grupos de camundongos serão submetidos a coleta de sangue e sacrifício nos dias 4, 7 e 14. Os pulmões e outros tecidos serão removidos para avaliar as cargas de *Mtb* e SARS-CoV-2, bem como uma série de outros testes e leituras (análise de expressão gênica e dosagem de citocinas) (figura 3). Todos os camundongos serão alojados de forma idêntica durante todo o experimento.

- **Objetivo VIII:** Identificar o perfil de proteínas expresso nos processos de infecção individual e coinfeção SARS-CoV-2 e *Mtb*
- Dosagem de biomarcadores inflamatórios e tempestade de citocinas

Para dosagem proteica de citocinas Th1, Th2 e Th17 das amostras de sangue e tecido derivadas dos animais será utilizado o kit Multiplex Luminex x MAP®, seguindo recomendações do fabricante. Os níveis serão determinados pelo BioPlex Pro equipamento Bio-Plex 200 e software Bio-Plex Manager, conforme instruções do fabricante.

- Purificação celular e ensaios de citometria

Para ensaios funcionais, os pulmões serão perfundidos com PBS para eliminar as células sanguíneas contaminantes, homogeneizadas em 5 mL de 0,5 mg / mL de colagenase D com 20 µg / mL de DNase (Roche), incubadas por 30 minutos a 37 ° C e depois passadas por uma 70 Filtro de células µM (BD). Os glóbulos vermelhos serão lisados com tampão de lise ACK (GIBCO). Antes da coloração de anticorpos, as células serão coradas com a coloração de células mortas fixável LIVE / DEAD (Life Technologies) para excluir células mortas da análise. As células serão divididas em dois grupos para identificar células imunes com marcadores de superfície específicos usando anticorpos conjugados por fluorescência específicos para (i) células mielóides (CD45, CD11b, CD11c, siglec F e Gr-1) e (ii) células linfóides (CD45 , CD3, CD4, CD8, CD25, CD62L e CD44). Os coquetéis de anticorpos para os dois tipos de células serão preparados em tampão de coloração BD Horizon Brilliant™ (BD Biosciences) e as células serão incubadas nesses coquetéis em gelo por 20 minutos, seguidas de uma lavagem com DPBS contendo 3% de FBS e tratadas com fixação e permeabilização solução (BD Biosciences). A citometria de fluxo será realizada em um LSRII Fortessa ou FACS Aria II (BD Biosciences) e os dados serão analisados com o software FlowJo V10.1 (TreeStar).

- Análises estatísticas

Todos os experimentos serão realizados utilizando camundongos aleatoriamente designados. Todos os experimentos serão realizados em duplicatas independentes, 4 camundongos por grupo, por ponto de tempo. A análise estatística será feita pelo Prisma GraphPad. Testes de normalização e de variância serão aplicados de acordo com a distribuição dos grupos. Para todos os testes será considerado estatisticamente significativo os valores de *p-value* < 0,05 em um intervalo de confiança (IC) de 95%.

c) **Resultados Esperados**

Espera-se como principal dado gerado neste projeto estabelecer um modelo animal de coinfeção *Mtb* e *SARS-CoV-2* para elucidar a identificação de vias genéticas de resposta imune e inflamatórias. Assim, segue os potenciais produtos gerados:

- Este modelo de coinfeção poderá indicar as vias de ativação gênica que influenciariam na resposta imune e inflamatória à infecção por *SARS-CoV-2* na coinfeção com o *Mtb*;
- Os testes com as drogas anti micobacterianas podem gerar dados importantes em relação ao reposicionamento e eficiência de drogas já eficazes contra o *Mtb*, mas ainda sem testes para coinfeção com o *SARS-CoV-2*.
- Os estímulos com vitamina D₃, hormônio esteróide capaz de regular a resposta imune e com papel já bastante estudado na infecção pelo *Mtb*, pode gerar dados relevantes no controle e influência na resposta inflamatória atuando como adjuvante terapêutico no tratamento dessas patologias individualmente ou no quadro de coinfeção.

e) Cronograma

Atividades	2022	2023	2024	2025
Etapa 01: Avaliação da ativação das respostas imune e inflamatória em modelo animal de coinfeção <i>Mtb</i> e <i>SARS-CoV-2</i>				
Elaboração do manuscrito 01				
Etapa 02: Avaliação da influência de drogas anti <i>Mtb</i> na resposta imune e inflamatória contra o <i>SARS-CoV-2</i> na coinfeção com o <i>Mtb</i> em modelo animal				
Elaboração do manuscrito 02				
Parte 03: Avaliação da ação da vitamina D ₃ como adjuvante terapêutico na infecção pelo <i>Mtb</i> e pelo <i>SARS-CoV-2</i> individualmente e na coinfeção em modelo animal				
Elaboração do manuscrito 03				
Elaboração do relatório final				

f) Orçamento

Ítem	Valor
Camundongos K18-hACE C57BL/6J hemizigótico (cepa: 2B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J)	R\$ 22.190,00
Alimentação, gaiolas, anestésicos	R\$5.680,00
Reagentes para os cultivos e ensaios de contagem/viabilidade do <i>Mtb</i> e do <i>SARS-CoV-2</i>	R\$3.500,00
Sistema de Exposição de Aerossóis Glas-Col	R\$2.800,00
Drogas anti <i>Mtb</i> (Rifampicina, Isoniazida e Etambutol) e Vitamina D ₃	R\$6.000,00
Kit kit Multiplex Luminex x MAP®	R\$4.200,00
Reagentes e plásticos para ensaios de expressão gênica: reagentes extração RNA por TRIzol, kit RNeasy Mini Kit method (Qiagen), kit <i>GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)</i> (Promega), MasterMix Universal e sondas fluorogênicas TaqMan.	R\$12.000,00
Material plástico	R\$4.300,00
Valor total	R\$60.670,00

g) Referências Bibliográficas

ABASSI, Zaid *et al.* The Lung Macrophage in SARS-CoV-2 Infection: A Friend or a Foe? *Frontiers in Immunology*, v. 11, 5 jun. 2020. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01312/full>>.

ARAVINDAN, PP. Host genetics and tuberculosis: Theory of genetic polymorphism and tuberculosis. *Lung India*, v. 36, n. 3, p. 244, 2019. Disponível em:

<https://journals.lww.com/10.4103/lungindia.lungindia_146_15>.

BEDNASH, JOSEPH S. *et al.* Syrian hamsters as a model of lung injury with SARS-CoV-2 infection: Pathologic, physiologic, and detailed molecular profiling.

Translational Research, v. 240, p. 1–16, fev. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524421002632>>.

CAÑAS, Carlos A. The triggering of post-COVID-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals. *Medical Hypotheses*, v. 145, p. 110345, dez. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987720325172>>.

- CARLOS, W. Graham *et al.* Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 201, n. 4, p. P7–P8, 15 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.2014P7>>.
- CASE, James Brett *et al.* Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology*, v. 548, p. 39–48, set. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682220301021>>.
- COPERCHINI, Francesca *et al.* The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 53, p. 25–32, jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610120300927>>.
- CRISAN-DABIJA, Radu *et al.* Tuberculosis and COVID-19: Lessons from the Past Viral Outbreaks and Possible Future Outcomes. *Canadian Respiratory Journal*, v. 2020, p. 1–10, 8 set. 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/crj/2020/1401053/>>.
- DAKAL, Tikam Chand. Antigenic sites in SARS-CoV-2 spike RBD show molecular similarity with pathogenic antigenic determinants and harbors peptides for vaccine development. *Immunobiology*, v. 226, n. 5, p. 152091, set. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298521000395>>.
- DE ALBUQUERQUE BORBOREMA, Maria Eduarda *et al.* Differential distribution in vitamin D receptor gene variants and expression profile in Northeast Brazil influences upon active pulmonary tuberculosis. *Molecular Biology Reports*, 3 set. 2020. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-020-05762-3>>.
- EGGENHUIZEN, Peter J. *et al.* BCG Vaccine Derived Peptides Induce SARS-CoV-2 T Cell Cross-Reactivity. *Frontiers in Immunology*, v. 12, 5 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.692729/full>>.
- EL-FAWAL, Rania; EL FAYOUMI, Hassan M.; MAHMOUD, Mona F. Diosmin and crocin alleviate nephropathy in metabolic syndrome rat model: Effect on oxidative stress and low grade inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 102, p. 930–937, jun. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S075333221737066X>>.
- ETNA, Marilena Paola *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: A two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology*, v. 26, n. 6, p. 543–551, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532314000955>>.

- FLESCH, Inge E.A.; KAUFMANN, Stefan H.E. Role of Cytokines in Tuberculosis. *Immunobiology*, v. 189, n. 3–4, p. 316–339, nov. 1993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298511803645>>.
- GIL-ETAYO, Francisco Javier *et al.* T-Helper Cell Subset Response Is a Determining Factor in COVID-19 Progression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, 26 fev. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.624483/full>>.
- HOSSAIN, Md. Murad; NORAZMI, Mohd-Nor. Pattern Recognition Receptors and Cytokines in Mycobacterium tuberculosis Infection—The Double-Edged Sword? *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–18, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/179174/>>.
- HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301835>>.
- KUDAY, D. A. Biomarkers and immunological tests. Experimental and clinical parallels of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis and Lung Diseases*, v. 98, n. 8, p. 63–74, 24 set. 2020. Disponível em: <<https://www.tibl-journal.com/jour/article/view/1454>>.
- LANG, Pierre Olivier; ASPINALL, Richard. Vitamin D Status and the Host Resistance to Infections: What It Is Currently (Not) Understood. *Clinical Therapeutics*, v. 39, n. 5, p. 930–945, maio 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291817302394>>.
- LIN, Ling *et al.* Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerging Microbes and Infections*, v. 9, n. 1, p. 727–732, 2020.
- LIU, Wang-Da *et al.* Accelerated progression of pulmonary tuberculosis in a COVID-19 patient after corticosteroid treatment. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 55, n. 2, p. 347–349, abr. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118221001778>>.
- LIU, Yongyu *et al.* Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. *medRxiv*, 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.10.20033795v1>>.
- LIVAK, K J; SCHMITTGEN, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.

- MASON, Robert J. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *European Respiratory Journal*, v. 55, n. 4, p. 2000607, abr. 2020. Disponível em: <<http://erj.ersjournals.com/lookup/doi/10.1183/13993003.00607-2020>>.
- MATHEMA, Barun *et al.* Drivers of Tuberculosis Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_6, p. S644–S653, 3 nov. 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_6/S644/4589580>.
- MATHIASSEN, Victor Dahl *et al.* Clinical features of tuberculous lymphadenitis in a low-incidence country. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 98, p. 366–371, set. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220305543>>.
- MENON, Sonia *et al.* Convergence of a diabetes mellitus, protein energy malnutrition, and TB epidemic: the neglected elderly population. *BMC Infectious Diseases*, v. 16, n. 1, p. 361, 26 dez. 2016. Disponível em: <<http://bmcinfctdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1718-5>>.
- MERAD, Miriam; MARTIN, Jerome C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 6, p. 355–362, 17 jun. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41577-020-0331-4>>.
- MILLER, Halli E.; ROBINSON, Richard T. Early Control of Mycobacterium tuberculosis Infection Requires *il12rb1* Expression by *rag1* -Dependent Lineages. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 11, p. 3828–3841, nov. 2012. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00426-12>>.
- 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. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/mi2014136>>.
- MOUSQUER, Gabriel Tassi; PERES, Alessandra; FIEGENBAUM, Marilu. Pathology of TB/COVID-19 Co-Infection: The phantom menace. *Tuberculosis*, v. 126, p. 102020, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979220301876>>.
- NOVIKOV, Aleksey *et al.* Mycobacterium tuberculosis Triggers Host Type I IFN Signaling To Regulate IL-1 β Production in Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 5, p. 2540–2547, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1100926>>.
- NUOVO, Gerard *et al.* Strong homology between SARS-CoV-2 envelope protein and a

Mycobacterium sp. antigen allows rapid diagnosis of Mycobacterial infections and may provide specific anti-SARS-CoV-2 immunity via the BCG vaccine. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 48, p. 151600, out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109291342030143X>>.

OCHANI, RohanKumar *et al.* COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. *Le infezioni in medicina*, v. 29, n. 1, p. 20–36, 1 mar. 2021. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33664170>>.

ONU. *Progresso global no combate à tuberculose está em risco, afirma OMS | As Nações Unidas no Brasil*. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/95855-progresso-global-no-combate-tuberculose-esta-em-risco-afirma-oms>>. Acesso em: 16 abr. 2022.

PEZZELLA, A. Thomas. History of Pulmonary Tuberculosis. *Thoracic Surgery Clinics*, v. 29, n. 1, p. 1–17, fev. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1547412718301282>>.

PINKY, Lubna; GONZÁLEZ-PARRA, Gilberto; DOBROVOLNY, Hana M. Superinfection and cell regeneration can lead to chronic viral coinfections. *Journal of Theoretical Biology*, v. 466, p. 24–38, abr. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519319300116>>.

RAJPURKAR, Pranav, et al. "AI in health and medicine." *Nature Medicine* (2022): 1-8.

RAMIREZ, Francisco E.; SANCHEZ, Albert; PIRSKANEN, Aki T. Hydrothermotherapy in prevention and treatment of mild to moderate cases of COVID-19. *Medical Hypotheses*, v. 146, p. 110363, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987720332540>>.

RIOU, Catherine *et al.* Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection. *Journal of Clinical Investigation*, v. 131, n. 12, 15 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/149125>>.

ROSAS MEJIA, Oscar *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. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1010093>>.

ROSSATO SILVA¹, Denise *et al.* Tuberculosis and COVID-19, the new cursed duet: what differs between Brazil and Europe? *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, p. 20210044, 30 abr. 2021. Disponível em:

<<http://www.jornaldepneumologia.com.br/about-the-authors/3508/en-US>>.

SADYKOV, Mukhtar *et al.* Association of genetic variations in the vitamin D pathway with susceptibility to tuberculosis in Kazakhstan. *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 3, p. 1659–1666, 13 mar. 2020. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s11033-020-05255-3>>.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, v. 184, n. 4, p. 861–880, fev. 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421000076>>.

SMITH, Issar. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 463–496, jul. 2003.

Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.16.3.463-496.2003>>.

STARSHINOVA, Anna A. *et al.* Molecular and Cellular Mechanisms of M. tuberculosis and SARS-CoV-2 Infections—Unexpected Similarities of Pathogenesis and What to Expect from Co-Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 4, p. 2235, 17 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/4/2235>>.

TAMUZI, Jacques L. *et al.* Implications of COVID-19 in high burden countries for HIV/TB: A systematic review of evidence. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 744, 9 dez. 2020. Disponível em:

<<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05450-4>>.

TAPELA, Kesego; OCHIENG' OLWAL, Charles; QUAYE, Osbourne. Parallels in the pathogenesis of SARS-CoV-2 and M. tuberculosis : a synergistic or antagonistic alliance? *Future Microbiology*, v. 15, n. 18, p. 1691–1695, dez. 2020. Disponível em:

<<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2020-0179>>.

UDWADIA, Zarir F. *et al.* COVID-19 -Tuberculosis interactions: When dark forces collide. *Indian Journal of Tuberculosis*, v. 67, n. 4, p. S155–S162, dez. 2020.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0019570720300743>>.

WANG, Chen *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 470–473, fev. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301859>>.

WEI, Meili *et al.* Pneumonia caused by Mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection*, v. 22, n. 6–7, p. 278–284, jul. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S128645792030099X>>.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. *Global Tuberculosis Report*. [S.l.: s.n.], 2021.

Disponível em: <file:///C:/Users/samsung/Downloads/9789240037021-eng (2).pdf>.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard / WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 16 fev. 2022.

XIE, Peng *et al.* Severe COVID-19: A Review of Recent Progress With a Look Toward the Future. *Frontiers in Public Health*, v. 8, 13 maio 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2020.00189/full>>.

YANG, Penghui; WANG, Xiliang. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 5, p. 555–557, 31 maio 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41423-020-0407-x>>.

ZHENG, Hong-Yi *et al.* Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 5, p. 541–543, 17 maio 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41423-020-0401-3>>.

ZHOU, Fei *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620305663>>.