

ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR CORONAVÍRUS NA PATOGENIA DA
TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Nina Aguiar Mothé

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes- RJ

2022

ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR CORONAVÍRUS NA PATOGENIA DA
TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Nina Aguiar Mothé

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em
Biociências e Biotecnologia do
centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dr^a. Elena Lassounskaia

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Campos dos Goytacazes- RJ
2022

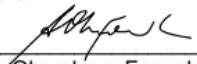
ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR CORONAVÍRUS NA PATOGENIA DA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Nina Aguiar Mothé


Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em
Biotecnologia do
centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia.

Aprovada em, 30 de setembro de 2022.

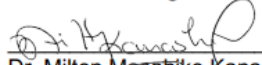
Banca Examinadora:



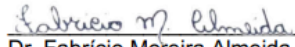
Dr.a Anna Lvovna Okorokova Façanha – LFBM/CBB/UENF
Doutora em Química Biológica (UFRJ – Brasil)



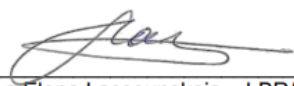
Dr. Edson Oliveira Delatorre – DB/CCENS/UFES
Doutor em Biologia Parasitária (Virologia) (FIOCRUZ– Brasil)



Dr. Milton Masahiko Kanashiro – LBR/CBB/UENF
Doutor em Biociências e Biotecnologia (UENF– Brasil)



Dr. Fabrício Moreira Almeida – LBR/CBB/UENF (Co-orientador)
Doutor em Biociências e Biotecnologia (UENF– Brasil)



Dr.a Elena Lassounskaia – LBR/CBB/UENF (Orientadora)
Doutora em Imunologia (IEM – Rússia)

ESTUDO DO IMPACTO DA INFECÇÃO POR CORONAVÍRUS NA PATOGENIA DA TUBERCULOSE EXPERIMENTAL

Nina Aguiar Mothé

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob a orientação da Profa. Dra. Elena Lassounskaia.

Apoio

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- LBR – Laboratório de Biologia do Reconhecer
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas bênçãos derramadas sobre mim todos os dias;

A toda minha família especialmente meus pais Luiz Cláudio Mothé e Adriana Mothé, minha irmã Luiza Mothé por todo apoio e amor incondicional, vocês são os maiores presentes da minha vida. Aos meus avós Romanita Aguiar, Cely Mothé e Elias Mothé (*in memoriam*), por serem exemplo de sabedoria e por todo amor e cuidado.

Agradeço também ao meu padrinho Rogério Aguiar, por sempre me incentivar em todas áreas da minha vida e especialmente em relação à minha formação na UENF;

A todos professores que colaboraram para minha formação pessoal e profissional;

À minha orientadora Dr^a. Elena Lassounskaia por todos ensinamentos e por confiar em mim para realizar esse trabalho;

Ao meu coorientador Dr. Fabrício Almeida que com toda sua generosidade e positividade me auxiliou neste trabalho;

A todo grupo do LBR e aos Elenetes por todo tempo de convívio no laboratório;

Aos técnicos do LBR Verônica Lanes, Núbia Alencar, Juliana Azevedo, Rita Escocard e Fernando Lopes por serem sempre solícitos e por todo suporte para a realização deste trabalho;

À Dr^a Maria Regina D'Império Lima por ceder espaço e materiais do Laboratório de imunologia de doenças infecciosas ICB/USP para a realização de experimentos;

Ao grupo de trabalho do Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, que me auxiliou no preparo das lâminas histológicas;

À Prof.^a Dr.^a Anna L. Okorokova-Façanha, ao Prof. Dr. Edson Oliveira Delatorre, ao Prof. Dr. Milton M. Kanashiro, à Dr.^a Giliane S. de Souza Cabral e Dr.^a Gislane de Almeida Santos por aceitarem fazer parte da banca examinadora;

Aos amigos Igor Santiago, Rebeka Souza e Bárbara Barcelos, que além de me acompanharem em experimentos, me deram suporte emocional e compartilharam vários momentos especiais comigo;

À UENF e todos os funcionários, por ser minha segunda casa durante esse tempo. Todo orgulho e admiração;

Aos órgãos de fomento, FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro da bolsa e do projeto;

Muito obrigada!

Sumário

Lista de figuras	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumo.....	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	16
1.1. Gênero Beta-coronavírus: vírus SARS-CoV-2 e MHV-1	16
1.2. Resposta imune a infecção viral causada pelo SARS-CoV-2 e MHV-1	18
1.3. A tuberculose (TB)	21
1.4. Resposta imune na tuberculose pulmonar.....	22
1.5. Coinfecção de <i>M. tuberculosis</i> e Coronavírus	25
2. Justificativa	26
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. Materiais e Métodos	28
4.1. Cultivo e preparo do estoque viral	28
4.2. Cultivo de micobactérias.....	28
4.3. Animais	29
4.4. Infecção dos camundongos com vírus da hepatite murino tipo 1 (MHV-1).....	29
4.5. Infecção dos camundongos com <i>M.tuberculosis</i> e coinfecção <i>M.tuberculosis</i> /MHV-1	30
4.6. Análises de patologia grossa e histopatologia do pulmão	30
4.7. Obtenção das células pulmonares.....	31
4.8. Análise da produção de mediadores inflamatórios	31

4.9. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar.....	32
4.10. Quantificação da carga bacteriana	32
4.11. Análise estatística dos dados	33
5. Resultados	33
5.1. Modelo de Síndrome respiratória aguda causado pelo MHV-1 em camundongos C57BL/6.....	33
5.2 Modelo de Síndrome respiratória aguda causado pelo MHV-1 em camundongos Balb/c <i>nude</i>	35
5.3. Impacto da coinfeção pelo vírus MHV-1 no curso da tuberculose experimental induzida em camundongos C57BL/6 e Balb/c <i>nude</i>	41
5.4. Impacto da coinfeção pelo vírus MHV-1 e <i>M. tuberculosis</i> na histopatologia do pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 e <i>nude</i>	44
5.5. Impacto da coinfeção pelo vírus MHV-1 e <i>M. tuberculosis</i> na produção de citocinas no pulmão dos camundongos C57BL/6 e Balb/c <i>nude</i>	51
5.6. Composição celular do infiltrado inflamatório do pulmão de camundongos Balb/c <i>nude</i> infectados por <i>M. tuberculosis</i> e MHV-1	54
6. Discussão.....	57
7. Conclusões.....	64
8. Referências	65
9. Anexos	71

Lista de figuras

Figura 1. Cinética do desenvolvimento de pneumonia nos camundongos C57BL/6 infectados via intranasal, pelo vírus MHV-1	34
Figura 2. Histopatologia do fígado de camundongos C57BL/6 infectados, via intranasal pelo vírus MHV-1	
Figura 3. Cinética do desenvolvimento de pneumonia em camundongos <i>nude</i> infectados pelo vírus MHV-1.	36
Figura 4. Alterações histopatológicas dos brônquios e alvéolos nos camundongos <i>nude</i> infectados pelo vírus MHV-1.	38
Figura 5. Características pulmonares histopatológicas da infecção por MHV-1 em camundongos (8 d.p.i) compartilhadas com a pneumonia e dano alveolar difuso associada ao COVID-19.....	39
Figura 6. Histopatologia do fígado dos camundongos <i>nude</i> infectados pelo vírus MHV-1.	40
Figura 7. Monitoramento do peso corporal de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfecção pelo Mtb e vírus.	42
Figura 8. Quantificação do peso do pulmão de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfectados.	43
Figura 9. Carga bacteriana nos pulmões de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfectados.	44
Figura 10. Modelo de coinfecção por <i>M. tuberculosis</i> e coronavírus MHV-1 em camundongos C57BL/6.....	45
Figura 11. Histopatologia do fígado dos camundongos C57BL/6 coinfectados pelo Mtb H37Rv e MHV-1.	46
Figura 12. Modelo de coinfecção por <i>M. tuberculosis</i> e coronavírus MHV-1 em camundongos Balb/c <i>nude</i>	48
Figura 13. Histopatologia do fígado de camundongos <i>nude</i> , coinfectados pelo Mtb e MHV-1.....	49
Figura 14. Histopatologia do rim de camundongos Balb/c <i>nude</i> infectados pelo Mtb H37Rv e vírus MHV-1.	50

Figura 15. Análise da produção de citocinas no sobrenadante da cultura de células pulmonares de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfeção pelo Mtb e vírus.....	53
Figura 16. Análise do perfil celular inflamatório do pulmão de camundongos Balb/c <i>nude</i>	57

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais mecanismos de coinfeção bacteriana em infecções respiratórias virais. Adaptado de Mirzaei et al., 2020.	25
Tabela 2. Principais características histopatológicas, causadas pelo coronavírus SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19 fatal, ou pelo MHV-1 nos camundongos Balb/c nude ou C57BL/6, infectados experimentalmente.....	59

Lista de abreviaturas

- ACE2 – do inglês, enzima conversora da angiotensina 2
- ACK - do inglês, *Ammonium-Chloride-Potassium*
- AIDS- Síndrome da Imunodeficiência adquirida
- ANOVA – Análise de Variância
- ATCC – do inglês, *American Type Culture Collection*
- BAAR - Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
- BCG - Bacilo de Calmète-Guérin
- BL/6 – Linhagem de camundongos C57BL/6
- CD - Grupamento de diferenciação
- CEACAM1 – do inglês, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*
- CFU - do inglês, *Colony-Forming Unit*
- COVID-19 – do inglês, coronavirus disease 2019
- DAD – Dano alveolar difuso
- D.O - Densidade ótica
- d.p.i – Dias pós infecção
- EDTA - do inglês, Ethylenediaminetetraacetic Acid
- H&E - coloração hematoxilina-eosina
- HCoV-HKU-1 – do inglês, *Human coronavirus HKU1*
- HCoV-OC43 - do inglês, *Human coronavirus OC43*
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFN - Interferon
- Ig - Imunoglobulina
- IL- Interleucina
- IRF- Fator Regulador de Interferon
- KO – do inglês, *knockout*, nocaute
- Lab-NB3 – Laboratório de Biossegurança Nível 3
- LPA Lesão Pulmonar Aguda

- LRR- do inglês, *leucine-rich-repeat*
- Ly6C - Complexo de antígeno linfocitário 6, locus C
- Ly6G - Complexo de antígeno linfocitário 6, locus G
- mCEACAM1 – receptor *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*
- M-CoV – do inglês, *Murine Coronavirus*
- MDA-5 – do inglês, *melanoma differentiation-associated protein 5*
- MERS-CoV – do inglês, *Middle East respiratory syndrome coronavirus/* coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio
- MHV – do inglês, *Murine Hepatite Virus*
- Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- NF- κ B – do inglês, *nuclear factor kappa B*
- NK – do inglês, *Natural killer*
- NLRP3 – do inglês, *NLR family pyrin domain containing 3*
- NO - Óxido nítrico
- OADC - Oleato, Albumina, Dextrose e Catalase
- p.i - Pós infecção
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PRR's - Receptores de reconhecimento padrão
- RAG – do inglês, *recombination-activating gene*
- RIG-1 - Gene I Induzível por Ácido Retinóico
- RNA – ácido ribonucléico
- ROS – do inglês, *reactive oxygen species*
- RPMI - Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*
- SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda grave
- SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda grave 2
- SCID – do inglês, *Severe combined immunodeficiency*
- SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
- SFB - Soro fetal bovino
- T α/β – Linfócitos T alfa beta
- T γ/δ – Linfócitos T gama delta

- TB - Tuberculose
- TCDI – do inglês, *tissue culture infectious dose*
- Th - Linfócito T Auxiliar
- TLR - Receptor do Tipo Toll
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alpha

Resumo

A pandemia de COVID-19 causou a maior crise de saúde global, afetando principalmente indivíduos com comorbidades, incluindo doenças pulmonares, como a tuberculose (TB). O objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo murino para estudo da COVID-19 e da comorbidade COVID-19/TB. Camundongos de linhagens resistente (C57BL/6) e susceptível (Balb/c *nude*, atímicos) foram infectados pelo coronavírus murino (MHV-1), ou pela cepa *M. tuberculosis* H37Rv, ou coinfectados por ambos. A morbidade dos animais e a histopatologia no pulmão, fígado e rins, foram monitoradas. A infecção intranasal de camundongos C57BL/6 pelo MHV-1 induziu nestes animais pneumonia intersticial viral e disseminação do vírus para o fígado, com recuperação após 17 dias da infecção, reproduzindo as características de doença similares à COVID-19 moderada em humanos. Camundongos *nude*, infectados pelo MHV-1, apresentaram vários elementos de histopatologia pulmonar compatíveis com à Síndrome respiratória aguda grave (SARS), descrito nos pacientes com COVID-19 severa. Os efeitos da coinfeção pelo coronavírus, na patolgia da TB experimental foram avaliados 8 e 17 dias após infecção viral. Em camundongos BL/6, a coinfeção não alterou significativamente o curso da TB ativa; na qual os animais foram capazes de controlar a infecção micobacteriana, com progressão lenta da patologia da TB e recuperação da infecção viral. Em camundongos *nude*, a coinfeção causou agravamento da TB, com progressão rápida da patologia pulmonar, necrose intragranulomatosa, permanência de pneumonia viral, e aumento das lesões patológicas no fígado e rins. Os resultados demonstram que foi desenvolvido um modelo experimental que permite investigar os impactos da infecção pelo coronavírus patogênico no curso da tuberculose pulmonar. Os dados obtidos sugerem que nos pacientes imunodeficientes com TB, a coinfeção pelo SARS-CoV-2 pode agravar curso natural das ambas as doenças, levando o agravamento rápido de patologia pulmonar e promovendo a disseminação dos patógenos aos outros órgãos.

Palavras-chave: Vírus de Hepatite Murina tipo 1; β -coronavírus; *M. tuberculosis*; Modelos de coinfeção em camundongos.

Abstract

The COVID-19 pandemic has caused the biggest global health crisis, mainly affecting individuals with comorbidities, including lung diseases such as tuberculosis (TB). The objective of this work was to develop a murine model for the study of COVID-19 and COVID-19/TB. Resistant (C57BL/6) and susceptible (Balb/c *nude*, athymic) strains were infected with murine coronavirus (MHV-1), or *M. tuberculosis* strain H37Rv, or coinfecting with both. Animal morbidity and histopathology in the lung, liver and kidneys were monitored. Intranasal infection of C57BL/6 mice by MHV-1 induced viral interstitial pneumonia and spread of the virus to the liver in these animals, with recovery after 17 days of infection, reproducing the characteristics of disease similar to moderate COVID-19 in humans. *Nude* mice infected with MHV-1 showed several elements of pulmonary histopathology consistent with the severe acute respiratory syndrome (SARS), described in patients with severe COVID-19. The effects of coronavirus co-infection on the pathogenesis of experimental TB were evaluated 8 and 17 days after viral infection. In BL/6 mice, coinfection did not significantly alter the course of active TB; the animals were able to control the mycobacterial infection, with slow progression of the TB pathology and recovery from the viral infection. In *nude* mice, co-infection caused worsening of TB, with rapid progression of lung pathology, intragranulomatous necrosis, permanence of viral pneumonia, and increased pathological lesions in the liver and kidneys. The results demonstrate an experimental model that allows investigating the impacts of infection by the pathogenic coronavirus on the course of pulmonary tuberculosis. The data obtained suggest that in immunodeficient patients with TB, co-infection with SARS-CoV-2 can worsen the natural course of both diseases, leading to a rapid worsening of the pulmonary pathology and promoting the spread of pathogens to other organs.

Keywords: Murine Hepatitis Virus type 1; β -coronavirus; *M. tuberculosis*; Coinfection models in mice.

1. Introdução

1.1. Gênero *Beta-coronavírus*: vírus SARS-CoV-2 e MHV-1

A pandemia do novo coronavírus segue avançando no mundo, com registro de mais de 609 milhões casos de infecção e mais de 6,5 milhões de casos fatais (dados referentes ao dia 18/09/2022, WHO, 2022) desde o primeiro caso registrado em dezembro de 2019 em Wuhan, China (WHO, 2020). O causador da doença foi nomeado, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus de Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2' ou SARS-CoV-2. O novo vírus pertence ao domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Pisuviricota*, classe *Pisoniviricetes*, ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero β -*coronavírus* e sub-gênero *Sarbecovírus* (ICTV, 2022). Anterior a descoberta do SARS-CoV-2, outros coronavírus do mesmo gênero eram conhecidos por acarretarem doenças em humanos. O HCoV-OC43 e HCoV-HKU-1 (sub-gênero *Embecovírus*) são causas comuns de resfriados e se originam de coronavírus de roedores; o SARS-CoV (sub-gênero *Sarbecovírus*) e MERS-CoV (sub-gênero *Merbecovírus*) causam infecções graves e epidemias e foram originados de coronavírus de morcegos (YE et al., 2020). SARS-CoV e MERS-CoV foram causadores da Síndrome Respiratória Aguda Grave em 2002 e Síndrome Respiratória do Oriente Médio em 2012, respectivamente (CUI; LI; SHI, 2019).

A doença causada pelo SARS-CoV2, nomeada COVID-19 foi amplamente estudada durante últimos três anos pelos pesquisadores do mundo inteiro, demonstrando que as vias respiratórias e o pulmão são os principais focos das manifestações clínicas e patológicas. Entretanto, a infecção pode causar danos em outros órgãos também, levando a falência múltipla de órgãos, em casos graves (ROBBA et al., 2020). O dano multi-órgão é causado por tempestade de citocinas, choque séptico, trombose e estresse oxidativo/nitrativo (XU et al., 2020). A disfunção múltipla de órgãos induzida pelo SARS-CoV-2 pode incluir insuficiência pulmonar aguda, hepática e renal progressiva, complicações neurológicas, doenças cardiovasculares e anormalidades vasculares e hematológicas (ROBBA et al., 2020; ZHAO et al., 2022).

O gênero *β-coronavírus*, também inclui outros vírus que não causam doenças em humanos, mas causam doenças em roedores. Entre estes, o coronavírus murino (M-CoV) é uma espécie que inclui cepas causadoras de doença epidêmica, com alta mortalidade, principalmente em colônias de camundongos de laboratório. Algumas cepas de M-CoV, causam encefalite desmielinizante progressiva e outros como o Vírus de Hepatite Murino (MHV) levam a doença disseminada, incluindo hepatite como manifestação clínica principal, mas também enterite, pneumonite, entre outras (W. BARTHOLD; L. SMITH, 2007).

O MHV foi primeiramente isolado em 1949 e hoje já se conhecem diversas cepas que diferem em virulência, patogenicidade e tropismo celular (W. BARTHOLD; L. SMITH, 2007). As cepas de MHV podem ser divididas em dois grupos relacionados ao tropismo: aquelas que possuem tropismo por células do trato respiratório superior, durante infecção inicial (vírus respiratório) e depois disseminam no organismo infectando diferentes tecidos (vírus politrópico); e as cepas do segundo grupo possuem tropismo pela mucosa intestinal (vírus enterotrópico) (HOMBERGER; ZHANG; BARTHOLD, 1998). As cepas enterotrópicas (MHV-DVIM, MHV-R1, MHV-Y) são considerados mais contagiosas, podendo ser transmitidas pelas fezes (W. BARTHOLD; L. SMITH, 2007). Os vírus respiratórios, após sua replicação inicial no epitélio nasal ou olfativo e de vias respiratórias superiores, disseminam para outros órgãos (fígado, pulmão, baço, linfonodos, rins e sistema nervoso), principalmente, nas linhagens dos camundongos suscetíveis (BALB/c, DBA/2, CBA, C3H/He), imunodeficientes (linhagens *nude*, SCID, RAG -/-) e em animais mais jovens (neonatal ou lactentes, até 4 semanas de vida). Entretanto, em animais mais resistentes, algumas cepas deste grupo podem apresentar maior tropismo para o fígado (vírus hepatotrópico, como MHV-1, MHV-2, MHV-3) ou para o sistema nervoso (vírus neurotrópico, MHV-JHM ou MHV-4). As cepas consideradas mais virulentas (MHV-3, MHV-A59) apresentam alto tropismo para ambos, causando severa hepatite e encefalite, que levam os animais infectados à morte (BARTHOLD *et. al*, 2007). Em camundongos geneticamente mais resistentes (C57BL/6, A/J, SJL) a severidade das ambas as manifestações é reduzida (LEVY *et al*. 1981; VIRELIZIER e ALLISON, 1976).

Devido à proximidade genética e compartilhamento de características patológicas, diferentes cepas de MHV como: MHV-1, MHV-3, MHV-A59 e MHV-JHM são utilizadas como modelos de estudo de infecções por SARS-CoV (KÖRNER et al., 2020). Dentre estas, destaca-se a MHV-1 que foi capaz de causar infecção respiratória aguda, reproduzindo patologia pulmonar semelhante a infecção humana por SARS-CoV (DE ALBUQUERQUE et al., 2006).

O SARS-CoV-2 e o MHV-1 além de pertencerem ao gênero *β-coronavirus*, representando vírus envelopado de RNA simples fita, são compostos por diversas proteínas não estruturais e quatro proteínas estruturais: de superfície ou pico (S), envelope (E), membrana (M) e nucleoproteína (N) (SATARKER; NAMPOOTHIRI, 2020). O MHV-1 ainda apresenta uma quinta proteína estrutural, a hemaglutinina esterase (HE) que possui atividade acetil esterase (KLAUSEGGER et al., 1999). Entretanto, estes dois vírus utilizam diferentes receptores para infectar as células do hospedeiro. O reconhecimento e primeiro contato com as células-alvo ocorre pela ligação da proteína de superfície S do vírus com o receptor ACE2 presente em células humanas, no caso do SARS-CoV-2 (WANG et al., 2020b), já o MHV-1 utiliza como receptor o antígeno carcinoembrionário murino, relacionado a molécula de adesão 1 (mCEACAM1), para entrada nas células hospedeiras (KÖRNER et al., 2020). A região N-terminal de MHV-1 liga-se a o domínio N-terminal de CEACAM1 (DVEKSLER et al. 1993), resultando em mudança conformacional em S2 que expõe um domínio que inicia a fusão com a membrana da célula hospedeira (GALLAGHER E BUCHMEIER, 2001). Estudos recentes demonstraram que as transições conformacionais necessárias para associação da proteína S com seu receptor e os processos de endocitose e fusão de membranas na internalização de partícula viral, apresentam várias similaridades na infecção pelo SARS-Cov-2 e MHV (JACKSON C, Farzan M., Chen B & Choe, 2022), como por exemplo a formação de estrutura S2 pós-fusão, quase idêntica (FAN et. al, 2020).

1.2. Resposta imune a infecção viral causada pelo SARS-CoV-2 e MHV-1

A resposta imune contra vírus começa a partir do desnudamento viral, ou seja, quando o material genético do vírus é liberado no citoplasma da célula hospedeira. O

RNA é reconhecido pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR's). Receptores do tipo toll (TLR-7 e TLR-8) ativam a via de NF- κ B que promove a produção das principais citocinas inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β . Receptores citoplasmáticos como RIG-1 (Gene indutível pelo ácido retinóico I) e MDA-5 (gene 5 associado à diferenciação de melanoma) ativam as vias IRF-7 e IRF-3 de produção de interferons do tipo 1 (INF- α e INF- β) que se apresentam como resposta imediata a infecções virais (KAWAI; AKIRA, 2006). Embora a indução de interferons do tipo 1 (IFN tipo 1) por RIG-1 seja bem caracterizada em infecções respiratórias virais, ela é independente de RIG-1 em infecções por MHV (LEE; CHANNAPPANAVAR; KANNEGANTI, 2020).

Estudos demonstraram que o SARS-CoV-2, assim como outros vírus, podem inibir a atividade viral bloqueando RIG-1 e conseqüentemente as vias IRF3/7, resultando em baixa produção de IFN tipo 1 (LEI et al., 2020). A supressão de IFN tipo 1 é uma característica comum da infecção por SARS-CoV, bem como outros coronavírus do grupo 2, incluindo o MHV-1 (MIRZAEI et al., 2020). Experimentos com camundongos nocaute para produção de IFN tipo 1 apresentaram infecção por MHV mais severa, demonstrando a importância da resposta IFN tipo 1 e que seu atraso pode levar ao desenvolvimento de pneumonia grave (CERVANTES-BARRAGAN et al., 2007; CHANNAPPANAVAR et al., 2016). Em casos graves de COVID-19 foi relacionada a redução de IFN tipo 1 no sangue dos pacientes com o aumento da carga viral e resposta inflamatória exacerbada (HADJADJ et al., 2020). Além disso, foram identificadas mutações em genes da via do IFN tipo 1 em pacientes infectados por SARS CoV-2 (ZHANG et al., 2020).

Os vírus ativam a via NF- κ B, que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e a formação do inflamassoma NLRP3 (receptor citoplasmático NOD-, LRR- e proteína 3 contendo domínio pirina), um complexo proteico citosólico que contribui para inibição da replicação viral, entretanto sua hiperativação causa severos danos ao organismo (TRIAANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2014). O inflamassoma ativa a via das caspases 1 levando a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 que contribuem para desenvolvimento de quadro hiperinflamatório, responsável pelo agravamento da patologia nos casos de COVID-19 (SHI et al., 2019). Por outro lado, mesmo não caracterizados os ligantes específicos do MHV que ativam o inflamassoma, um estudo

demonstrou que a deleção de alguns de seus componentes aumentou a apoptose e necroptose após 8h de infecção por MHV (ZHENG et al., 2020). Outro experimento revelou que a ausência de caspase 1 e 11 deixaram camundongos mais vulneráveis a infecção por MHV e apresentaram replicação viral elevada em comparação com as linhagens selvagens, pela falta de sinalização do inflamassoma (ZALINGER; ELLIOTT; WEISS, 2017).

Linfopenia e eosinofilia associadas à COVID-19 são considerados preditores da severidade da doença, portanto ajudam no diagnóstico como biomarcadores e possível alvo de intervenção para minimizar riscos (AZKUR et al., 2020). Em pacientes graves foi observada a diminuição do número total de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, células B, como também de células *natural killer* (NK). A exposição viral (alta ou baixa carga) pode influenciar as respostas dos linfócitos, que tendem a diminuir na medida que a doença progride e a redução do número de eosinófilos se correlaciona positivamente com o número de linfócitos em casos graves de COVID-19 (BERMEJO-MARTIN et al., 2020).

Experimentos com MHV-1 também associaram atividade de células T à patologia. Eles demonstraram que a depleção de TCD4 e TCD8, em camundongos de linhagens suscetíveis (C3H/HeJ e A/J) melhorou a severidade da doença. Além disso, a deposição de fibrina nos alvéolos e formação de edema foram reduzidos, como também apresentaram níveis mais baixos de INF- γ (KHANOLKAR et al., 2009). Por outro lado, nesse mesmo estudo foi visto que a depleção de células NK em camundongos resistentes B6, infectados com MHV-1 aumentou a morbidade e mortalidade dos animais (KHANOLKAR et al., 2009).

Semelhante a outras infecções virais, na maioria dos casos de COVID-19 observou-se a produção de anticorpos IgM na fase aguda e IgG em fases posteriores. Entretanto, houveram relatos dos níveis de IgG encontrados elevados ao mesmo tempo ou até antes da produção de IgM (LONG et al., 2020). Esses achados podem estar relacionados a reatividade cruzada com IgG previamente existente devido a outros coronavírus. A produção de IgA destacou-se importante para combater a infecção pelo SARS-CoV, assim como foi demonstrado no contexto da infecção por influenza, no qual IgA desempenha papel crucial na proteção das superfícies da mucosa, neutralizando

ou impedindo a fixação do vírus na mucosa do epitélio (AZKUR et al., 2020). O MHV-1, em linhagens de camundongos suscetíveis também produz anticorpos neutralizantes e a transferência de soro com esses anticorpos para camundongos não infectados teve efeito protetor reduzindo a carga viral e morbidade, quando posteriormente foram infectados com MHV-1 (KHANOLKAR et al., 2009).

A infecção, tanto em humanos (SARS-CoV-2) como em camundongos (MHV-1), pode levar ao desenvolvimento da pneumonia viral com intensa inflamação pulmonar e liberação massiva de citocinas inflamatórias. Essa rede complexa de eventos é denominada “tempestade” de citocinas sendo as principais: IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-17, IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e ativação do complemento (AZKUR et al., 2020; DE ALBUQUERQUE et al., 2006). A tempestade de citocinas é uma característica comum em casos graves e uma das principais razões para o desenvolvimento da síndrome respiratória aguda grave e falência múltipla de órgãos (RUAN et al., 2020).

1.3. A tuberculose (TB)

A tuberculose (TB) é uma doença crônica granulomatosa infectocontagiosa, causada pelo agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que pertencem ao reino *Bacteria*, filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetes*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium* (ITS, 2022). O Mtb afeta majoritariamente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas também pode acometer ossos, pleura, sistema urogenital e meninges. Na maioria dos casos de TB pulmonar, os sintomas apresentados são: tosse por mais de duas ou três semanas, falta de apetite, perda de peso, suores noturnos e febre (NUNN et al., 2005).

Apesar de negligenciada, a TB se destaca como um sério problema de saúde global e está entre as 10 principais causas de morte no mundo. Em 2020 estimou-se 1,3 milhões de mortes registradas, entre pessoas sem a infecção pelo HIV. A pandemia de COVID-19 contribuiu para a redução de diagnósticos e aumento de mortes (5,6%), no ano de 2020 (WHO, 2021).

A vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin), cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* desenvolvida pelos cientistas franceses Albert Calmette e Camille Guérin entre

1908 e 1921 (FINE et al., 1999), é o método de prevenção mais utilizado, protegendo crianças e recém-nascidos das formas graves da TB primária disseminada e da meningite tuberculosa. Entretanto, a vacina não previne a doença pulmonar em adultos de forma satisfatória (KAUFMANN; HUSSEY; LAMBERT, 2010). Atualmente, o tratamento convencional da TB é composto por rifampicina, estreptomicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, os quais representam fármacos de primeira linha. O tratamento é realizado pelo período de 6 meses a 1 ano, dependendo do quadro e resposta clínica do paciente (SACCHETTINI; RUBIN; FREUNDLICH, 2008).

Embora tenha vacina e tratamento para TB, estes são insuficientes para redução da carga global de infecções. Alguns dos fatores que contribuem para elevadas taxas da doença são: surgimento de micobactérias resistentes aos medicamentos (KUMAR et al., 2011), aumento dos casos de coinfeção com o HIV (BELL; NOURSADEGHI, 2018) e virulência da cepa infectante (KOUL et al., 2011 e KUMAR et al., 2011). Cepas hipervirulentas provocam inflamação grave, associada a alta carga bacilar e elevado nível de dano e necrose no pulmão (RIBEIRO et al., 2014; AMARAL et al., 2014).

1.4. Resposta imune na tuberculose pulmonar

O Mtb, agente causador da TB, é transmitido por meio de gotículas de saliva contendo o bacilo. Uma pessoa com TB pulmonar ativa pode transmitir o Mtb ao falar, tossir ou espirrar. O indivíduo saudável se infecta ao inalar o aerossol contendo o bacilo que migra pelo trato respiratório até chegar aos alvéolos pulmonares, onde são fagocitados por macrófagos alveolares e células dendríticas (OTTENHOFF; KAUFMANN, 2012).

O reconhecimento do Mtb pelos macrófagos envolve uma cascata de sinalização, via interação de moléculas presentes nas micobactérias e receptores de reconhecimento padrões (PRRs), presentes na superfície dos fagócitos (LASUNSKAIA et al., 2006). A ativação dos macrófagos induz produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 α e IL-1 β , espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que ativam células endoteliais dos capilares sanguíneos adjacentes a

expressarem moléculas de adesão, possibilitando o recrutamento e a diapedese de outras células inflamatórias para o local da infecção (COOPER, 2009).

O acúmulo de células imunes no foco da infecção inicia a formação do granuloma, estrutura característica da resposta imunológica na tuberculose que contribui para a contenção do crescimento micobacteriano. Ele é composto por macrófagos infectados, macrófagos epitelióides, *foam cell* (macrófagos espumosos que acumulam lipídeos) e neutrófilos no interior da estrutura, assim como linfócitos, na periferia (SAUNDERS; BRITTON, 2007; TORRADO; ROBINSON; COOPER, 2011).

A resposta imunológica mediada por células é predominante em infecções micobacterianas. Os linfócitos T ativados iniciam a produção de IFN- γ , acelerando a infiltração celular no local da lesão e ativando ainda mais macrófagos na resposta contra os bacilos. A presença dos linfócitos Th1 e a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α conduzem o desenvolvimento e organização do granuloma. As células TCD8+ contribuem para a amplificação da resposta dos macrófagos com a produção de IFN- γ e levam à morte das células infectadas via indução de FAS/FASL ou perforinas e granzimas (CANADAY et al., 2001; FERRAZ et al., 2006). Os linfócitos Th17 também participam da resposta imune contra micobactérias com a secreção de quimiocinas e citocinas, que auxiliam o recrutamento de neutrófilos e células Th1 para o local da infecção (KHADER; COOPER, 2008).

A TB é caracterizada por uma severa inflamação pulmonar, devido ao desbalanço na resposta imune contra o Mtb conduzindo à imunopatologia (CADENA; FORTUNE; FLYNN, 2017). Apesar da produção de mediadores inflamatórios ser essencial para a resposta imune contra Mtb, em casos clínicos severos, o estado inflamatório exacerbado aumenta de forma descontrolada o recrutamento de novas células imunes para o local de infecção e conseqüente produção aumentada de mediadores químicos. Esses fatores resultam em graves danos teciduais, fibrose pulmonar e formação de cavernas (buracos nos pulmões), gerando sequelas graves aos pacientes, como obstrução pulmonar crônica e insuficiência respiratória (HUNTER et al., 2006).

Na tuberculose, o Mtb pode ser eliminado após a infecção, se manter em latência (TB latente) ou desencadear uma infecção produtiva (TB ativa). A latência faz

parte da imunidade protetora, atribuída classicamente a atividade coordenada de respostas das células T CD4+. Aproximadamente 90% dos indivíduos infectados, conseguem controlar a disseminação das micobactérias e desenvolvimento de forma ativa da doença (PHILIPS; ERNST, 2012). O indivíduo em estado de latência pode desencadear a reativação da tuberculose, ou tuberculose pós-primária, que acontece em cerca de 5 a 10% da população infectada. Ela ocorre devido a fatores como imunossupressão, coinfeções virais como TB/HIV, entre outros (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Não há modelos animais que reproduzam a TB latente, existem trabalhos que usam tratamentos com drogas para induzir latência e outros recentes, com inativação transitória de genes essenciais ao Mtb (SU *et al.* 2021), mas ainda é um desafio para as pesquisas.

Para a reprodução da TB experimental em animais, modelos murinos são comumente utilizados devido a sua praticidade, baixo custo e disponibilidade de recursos materiais para a pesquisa (RYDELL-TÖRMÄNEN e JOHNSON, 2019). Foi demonstrado que a infecção intratraqueal em camundongos, de linhagens resistentes (como C57BL/6) à micobactéria, com baixa dose de bacilos (100 bacilos), utilizando cepa laboratorial Mtb H37Rv induz a doença de progressão lenta, com desenvolvimento de granulomas sólidos no pulmão, que crescem lentamente durante pelo menos um ano, sem desenvolvimento de necrose intragranulomatosa (RIBEIRO *et al.*, 2016, AMARAL *et al.*, 2017, ALMEIDA *et al.*, 2017). Em camundongos das linhagens suscetíveis, e principalmente em camundongos imunodeficientes (linhagem *nude* Balb/c *nude* atímicos, ou KO IFN- γ -/-, IRF-/-, ou TNF α -/-), a progressão de doença ocorre mais rápido, levando em casos graves a pneumonia tuberculosa e morte precoce dos animais (ORME e COLLINS, 1994). Para estudar efeitos das comorbidades ou coinfeções com outros patógenos, no curso natural da TB, o modelo de infecção crônica do camundongo, que não leva o animal à morte rápida, apresenta uma vantagem, permitindo avaliar possíveis alterações na severidade da patologia e doença em geral.

1.5. Coinfecção de *M. tuberculosis* e Coronavírus

Estudos demonstraram que coinfeções bacterianas são recorrentes em infecções respiratórias virais e um dos fatores que influenciam a mortalidade dos indivíduos acometidos. O relato mais antigo de coinfeção viral/bacteriana ocorreu no surto de influenza em 1918 no qual a maioria das mortes foram resultado de coinfeção com bactérias infecciosas (KAWAI; AKIRA, 2006). Infecções virais promovem colonização bacteriana das vias aéreas por diversos mecanismos como descrito na **tabela 1**.

Tabela 1. Principais mecanismos de coinfeção bacteriana em infecções respiratórias virais. Adaptado de Mirzaei et al., 2020.

MECANISMO	DESCRIÇÃO
Aumento da aderência bacteriana devido à infecção viral	Os vírus podem modular a superfície de receptores de membrana, aumentando assim a adesão bacteriana.
Destruição celular por enzimas virais	Enzimas virais destroem glicoproteínas da mucosa, principalmente aquelas que inibem ligação bacteriana.
Redução da limpeza mucociliar	Os vírus podem reduzir a limpeza mucociliar levando à diminuição da produção de materiais bactericidas.
Redução da quimiotaxia	Os vírus podem diminuir o efeito de fatores quimiotáticos, levando à redução da resposta celular ao ataque de organismos.
Efeito direto na fagocitose e indução de funções de macrófagos alveolares	Os vírus atrapalham ou modificam uma série de funções imunológicas, como fusão fagossomo-lisossoma e morte intracelular.
Indução de fagócitos imaturos	O vírus pode romper macrófagos e substituí-los por fagócitos imaturos.
Redução dos níveis de surfactante	O vírus prejudica a função do pneumócito alveolar tipo 2.
Indução de disbiose do microbioma do trato respiratório inferior	A disbiose do microbioma pode afetar a resposta imune da infecção viral respiratória.
Desregulação de respostas imunes inata e adaptativa	Infecção viral diminui o número de macrófagos alveolares através de apoptose.
Modulação da apoptose e inflamação	A autofagia e a apoptose facilitam pneumonia bacteriana secundária após infecção viral.
Redução da função imune antibacteriana no epitélio respiratório	A infecção viral respiratória leva à predisposição para infecções bacterianas secundárias, através do desvio do estado imunológico do trato respiratório.
Desregulação da imunidade nutricional	Alguns vírus podem subverter a proteção nutricional para promover infecções bacterianas.
Imunossupressão	A imunossupressão é induzida por vários vírus como HIV.
Sinergismo durante coinfeção bacteriana e viral	Ambos vírus e bactérias desempenham papel na imunopatogenicidade da coinfeção.
Liberação de bactérias planctônicas dos biofilmes	Os vírus podem manipular muitos fatores como quimiocinas e peróxido de hidrogênio levando a ruptura da estrutura do biofilme.

Além da infecção viral poder aumentar a susceptibilidade de infecções bacterianas secundárias há a possibilidade que ela reative a TB latente ou agrave a TB ativa. A comorbidade de TB e COVID-19 vem sendo estudada e avaliada a hipótese de que ambas possam exacerbar os sintomas naturais uma da outra e ter impactos negativos na saúde do paciente, como foi observado em casos de coinfeção SARS-CoV/TB (ALFARAJ et al., 2017; LOW et al., 2004; SU; CHEE, 2006). Ambas as infecções causam inflamação pulmonar grave, que pode levar a “tempestade de citocinas” e a coinfeção pode agravar o quadro clínico.

2. Justificativa

As graves consequências na saúde pública e na economia mundial da pandemia de COVID-19 levaram à necessidade de desenvolvimento de novas terapias e vacina. Este tipo de trabalho exige utilização de modelos animais para estudar a patogenia de doença, sua comorbidade com outras infecções prevalentes e testar eficácia de novos fármacos. Nos países de alta incidência da tuberculose, como o Brasil, estudo do impacto do COVID-19 no curso natural da TB ativa e na TB latente é de extrema importância. Este trabalho visa o desenvolvimento e implantação de modelo murino para estudo da COVID-19 e da TB associada à COVID-19, com intuito de verificar a hipótese que o acometimento por COVID-19 e a resposta imunológica antiviral associada à doença podem contribuir para a reativação da TB latente ou para o agravamento da TB ativa.

Um modelo da TB crônica, de progressão lenta, foi estabelecida no nosso laboratório, baseado na infecção intratraqueal de camundongos C57BL/6, pela cepa laboratorial Mtb H37Rv, em baixa dose de infecção (RIBEIRO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017). Para estudos de patogenia da COVID-19 foram sugeridos vários modelos de infecção em camundongos, incluindo modelos de camundongos geneticamente modificados para expressar ACE2 humano e infectados pelo SARS-CoV-2 (GOLDEN *et al.*, 2020) e modelos de camundongos isogênicos infectados por diferentes cepas de MHV, como por exemplo a infecção de camundongos C57BL/6 com MHV-3 (Andrade *et al.*, 2021) ou a infecção de camundongos A/J com MHV-1 (PAIDAS *et al.*, 2021;

PAIDAS *et al*, 2022). No modelo de Andrade e colaboradores (2021), foram reproduzidos vários elementos de patologia multi-órgão, semelhantes ao observado em biópsias de pacientes de COVID-19. Entretanto, esse modelo levou a morte dos animais infectados, após 7-9 dias de infecção. Para avaliar coinfeção, é preciso desenvolver um modelo de infecção que não leve os animais a morte precoce por nenhuma das doenças estudadas. Por isso, utilizamos as cepas de patógenos de virulência moderada (cepa Mtb H37Rv e cepa viral MHV-1) e infectamos uma linhagem de camundongos resistentes (C57BL/6) e uma linhagem imunodeficiente (Balb/c *Nude*, atímica), caracterizada pela ausência dos linfócitos T α/β maduros, mas que possui linfócitos T γ/δ , células B, células NK, fagócitos mononucleares e polinucleares, que podem contribuir com uma proteção parcial contra patógenos intracelulares.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da infecção por coronavírus na patogenia da tuberculose experimental.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Estabelecer modelo experimental murino da síndrome respiratória aguda moderada similar a COVID-19 por meio da infecção respiratória de camundongos C57BL/6 pelo coronavírus murino MHV-1;
- 2) Estabelecer modelo experimental murino da síndrome respiratória aguda grave similar a COVID-19 por meio da infecção respiratória de camundongos Balb/c *nude* pelo coronavírus murino MHV-1;
- 3) Estabelecer modelo experimental murino da coinfeção MHV-1 e *M. tuberculosis* em camundongos C57BL/6;
- 4) Estabelecer modelo experimental murino da coinfeção MHV-1 e *M. tuberculosis* em camundongos Balb/c *nude*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultivo e preparo do estoque viral

A cepa de coronavírus murino, MHV-1, foi adquirida no ATCC, Manassas, VA (número: VR-261; número do lote: 70035195). Para propagação viral primária e geração do estoque, o vírus foi inoculado via intraperitoneal nos camundongos Balb/c nude, de 7 a 14 dias da idade de acordo com as recomendações da ATCC e protocolos estabelecidos e descritos em *Current Protocols in Immunology* (BRIZIĆ *et al.*, 2020). Após 6 dias, animais infectados foram eutanasiados e os pulmões, fígados e baços foram coletados e processados para obtenção dos sobrenadantes. Os sobrenadantes com partículas virais e pedaços do tecido, não processados foram congelados e armazenados no freezer a -70°C . Todos os protocolos de infecção dos camundongos foram aprovados pela CEUA/ UENF (protocolo nº 482/2021).

4.2. Cultivo de micobactérias

Para os experimentos de infecção foram utilizadas cepas de virulência intermediária – *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC25618). As micobactérias foram descongeladas e cultivadas até atingir fase logarítmica de crescimento em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase - Difco Laboratories), em estufa bacteriológica à 37°C e 5% de CO_2 . Antes do uso, as culturas estavam em constante agitação no vórtex (BIOMATIC) e foram sonicadas em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800–UNIQUE) por 1 minuto para dispersão dos grumos (FATTORINI *et al.*, 2002). O monitoramento do crescimento micobacteriano foi feito por meio da mensuração de densidade ótica (D.O) da cultura por espectrofotometria a 600 nm (Biochrom, modelo Libra S6).

O ajuste da concentração bacteriana a ser utilizada nos experimentos foi realizado por meio da leitura prévia de 1 mL de cada cultura micobacteriana em suspensão em espectrofotômetro a 600nm, subtraído da D.O do meio de cultura 7H9 somente suplementado. Posteriormente, a diluição da suspensão micobacteriana

obedece ao critério de relação da densidade óptica versus número de bacilos (D.O 0,100 X 2×10^7 bacilos/mL).

Para o ensaio de contagem em meio sólido, as micobactérias foram cultivadas, em meio Ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com meio de enriquecimento OADC (DIFCO), por 21 dias em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂.

Todos os procedimentos com *M. tuberculosis* foram realizados em fluxos laminares no laboratório de Biossegurança NB3 do CBB/ UENF de acordo com as regras de Biossegurança, utilizando os equipamentos de proteção individual e coletiva apropriados. Os animais infectados com Mtb foram mantidos em microisoladores (estantes ventiladas com filtros HEPA) no biotério do Laboratório de Biossegurança Nível 3.

4.3. Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/6 e Balb/c *nude* com idade entre 6 e 8 semanas, machos, fornecidos pelo biotério central do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Animais não infectados foram usados como controle. Todos os animais (infectados e controles não infectados) foram observados e pesados semanalmente para acompanhar eventual morbidade (mudança de comportamento, emagrecimento alterações de pelagem, apetite, perda de peso corporal).

4.4. Infecção dos camundongos com vírus da hepatite murino tipo 1 (MHV-1)

Para desenvolvimento do modelo de infecção intranasal de camundongos por coronavírus com a doença pulmonar grave ou moderada foi utilizada uma linhagem de camundongos suscetíveis Balb/c *nude* e uma linhagem resistente (C57BL/6) a infecção por patógenos intracelulares, como vírus e micobactérias (KHANOLKAR et al., 2009, 2010). Os animais de ambas as linhagens foram anestesiados com xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal e inoculados via intra-nasal com dose sub-letal de infecção, $2,8 \times 10^5$

TCDI no volume de 40 μ L, sendo 20 μ L em cada narina com os animais erguidos pelas orelhas em posição vertical.

4.5. Infecção dos camundongos com *M.tuberculosis* e coinfeção *M.tuberculosis*/MHV-1

Camundongos das linhagens C57BL/6 e Balb/c *nude* foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), via intraperitoneal, e infectados intratraquealmente com carga de infecção de 100 bacilos em 50 μ L de PBS 1x estéril por animal, utilizando a cepa Mtb H37Rv para induzir a doença moderada (AMARAL et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014). Para experimentos de coinfeção, os camundongos infectados com Mtb foram submetidos a infecção pelo MHV-1 no dia 28 após infecção com micobactéria.

Os animais infectados pelo MHV-1 foram eutanasiados, necropsiados e examinados para análise de patologia no dia 8 e 17 após infecção com vírus. Em experimentos com infecção pelo Mtb ou de coinfeção, os animais foram examinados no dia 28, 36 e 45 após infecção com micobactéria.

4.6. Análises de patologia grossa e histopatologia do pulmão

Para avaliação da patologia, os pulmões foram extraídos e pesados para comparar o peso de órgão em animais de diferentes grupos. Os lóbulos médios do pulmão direito (indicados para extração de bactéria e/ou vírus) e pulmão esquerdo (indicado para isolar células do pulmão) foram pesados separadamente. Os lóbulos superior e inferior do pulmão direito foram fixados em formol 10% tamponado, por 48 h antes do processamento para histologia. Os estudos histopatológicos foram realizados nos cortes dos lóbulos do pulmão direito a partir da coloração com hematoxilina-eosina (H&E) para a visualização das alterações patológicas, pelo método de Ziehl-Neelsen para detecção da presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) e pelo método de Masson, de coloração tricromo, para detecção de colágeno depositado no tecido. Os cortes corados com H&E foram analisados por microscopia óptica (microscópio Axioplan 2, Carl Zeiss, Inc.) e as imagens de cortes capturadas através do dispositivo Axiocam MCR-5 (Zeiss).

4.7. Obtenção das células pulmonares

Para a obtenção das células pulmonares, o pulmão esquerdo e dois lóbulos do pulmão direito, que não foram fixados foram pesados, macerados e mantidos acondicionado em meio RPMI no gelo. A seguir foi adicionado 1mL de colagenase do tipo IV, para digestão tecidual sendo incubado em estufa à 37° C, por 40 minutos sob agitação. Os homogenatos foram filtrados em *cell strainer* de malha de 70µm (BD Biosciences, Lincoln Park, NJ), para separação das células dos pedaços de tecidos. Uma parte do homogenato obtido foi destinado à quantificação da carga bacteriana e viral, o restante processado para obtenção de células, no qual as hemácias foram removidas por meio do tratamento com tampão de lise ACK (NH₄Cl, KHCO₃ e EDTA) por 4 minutos. Em seguida as suspensões celulares foram lavadas com 10 mL PBS 1X estéril com 10% de soro fetal bovino, com centrifugação à 400 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em 2 mL de meio RPMI com 10% soro fetal bovino e 0,05 mg/mL de gentamicina. As células foram mantidas em gelo e uma alíquota de cada amostra diluída 10 vezes. 50 µL de cada amostra diluída, foram coradas com 50 µL solução de 1% de Azul de Trypan e fixados 4% de paraformaldeído por 5 min e posteriormente as células foram contadas em câmara de Neubauer para determinar a concentração celular de cada amostra.

4.8. Análise da produção de mediadores inflamatórios

As células provenientes do processamento dos pulmões, como descrito no item acima foram plaqueadas e cultivadas 5x10⁵ células/mL por 48h em estufa à 37°C, em meio RPMI suplementado 10% de SFB, e 0,05 mg/mL de gentamicina. Após 48h de cultivo, o sobrenadante da cultura foi coletado, filtrado com filtros de 0,22 µm, para eliminar eventuais micobacterias e congelado a -80°C até a quantificação dos níveis de citocinas. Após descongelamento, as citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10, IL-1β foram avaliadas pelo kit DuoSet ELISA R&D Systems, de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do mediador inflamatório óxido nítrico (NO) foi realizada pelo método de Griess.

4.9. Análise fenotípica do infiltrado celular pulmonar

A partir das células obtidas do pulmão (descrito acima no item 4.7), alíquotas de 2×10^5 células/mL de cada amostra foram incubadas com anticorpos conjugados com fluorocromos. Os anticorpos utilizados para as análises foram: anti-CD45, anti-CD11b, anti-Ly6G, anti-CD11c, anti-Ly6C, marcados respectivamente pelos fluorocromos: APC, PE, FITC, APC cy7, PE cy7 (BD Biosciences). A sonda *Live/Dead* (Thermo Fisher) foi usada para distinguir células vivas e mortas. Após a marcação as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído *overnight*. As células foram adquiridas usando citômetro de fluxo (BD FACS Symphony A1) e analisadas no *software* FlowJo (BD Biosciences). Primeiramente, selecionamos somente a população de células viáveis, em seguida analisamos a população de células hematopoiéticas CD45+. Dentro da população CD45+, selecionamos as células positivas para o marcador CD11b e negativas para CD11c (CD11b+CD11c-), também selecionamos dentre as células CD45+, uma população menor, positiva para CD11c e negativa para CD11b (CD11b-CD11c+). Dentro da população CD11b+CD11c-, analisamos a população de monócitos (Ly6C+ Ly6G-) e de neutrófilos (Ly6C- Ly6G+).

4.10. Quantificação da carga bacteriana

Para quantificação da carga bacilar, uma alíquota de 100 μ L do homogenato obtido após 10 ciclos de homogeneização (item 5.9) foi destinado a teste CFU (unidades formadoras de colônias). Para a quantificação bacteriana, a alíquota foi diluída em diluições seriadas 1:1000, 1:10000 e 1:100000 em PBS estéril, em que 50 μ L da de cada diluição foi semeada em placa de ágar 7H10 + 10% de OADC. As placas foram lacradas e incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 21 dias até quantificação das colônias bacterianas. O cálculo do título bacteriano foi feito multiplicando o número médio de colônias por placa de ágar pelo valor de diluição para determinar a concentração. Os resultados foram apresentados como número CFU por grama de tecido pulmonar.

4.11. Análise estatística dos dados

As análises estatísticas intergrupos, para comparar o número de células, carga bacteriana e viral e dosagem de citocinas foram realizadas utilizando o programa estatístico Prisma (GraphPad Prism 8.0). O teste *One-way* ANOVA e o teste *post hoc* de Tukey foram usados, para avaliar os efeitos de um parâmetro entre mais de 2 grupos. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Modelo de Síndrome respiratória aguda causado pelo MHV-1 em camundongos C57BL/6

Como primeira etapa na realização deste projeto, avaliamos a patologia que pode ser induzida nos camundongos resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (*nude*) ao coronavírus murino.

Os camundongos C57BL/6 foram infectados via intranasal, pelo vírus MHV-1 ($2,8 \times 10^5$ TCDI). As análises histopatológicas do pulmão e do fígado foram realizadas nos dias 8 e 17 pós-infecção (p.i). Após 8 dias de infecção foram observados numerosos infiltrados celulares, de tamanhos variados pequenos ou médios, compostos principalmente por linfócitos e monócitos, como indicados pelas setas pretas na **figura 1.A**. Esses infiltrados se apresentaram mais densos em volta de vasos sanguíneos e bronquíolos (**figura 1.B**). Nesse período de infecção (8 d.p.i), além do infiltrado celular difuso, também observou-se fluido seroso em alguns alvéolos (**figura 1.C**) e congestão de vasos sanguíneos, sem lesão alveolar (**figura 1.A**), apresentando o quadro histopatológico de pneumonia intersticial viral. No dia 17 p.i, os animais apresentam sinais de recuperação da infecção, uma vez observado diminuição do número e tamanho dos infiltrados inflamatórios (**figura 1.D, 1.E e 1.F**).

Foi observada a disseminação da infecção para o fígado. Na **figura 2** pode-se observar pequenos e difusos infiltrados inflamatórios no parênquima do fígado, após 8 dias de infecção (**figura 2. B e 2.C**), com tendência à redução de tamanho e número

dos infiltrados no dia 17 p.i. Assim como o pulmão, o fígado dos animais C57BL/6 demonstrou melhoras na histopatologia do último período de análise (17 d.p.i).

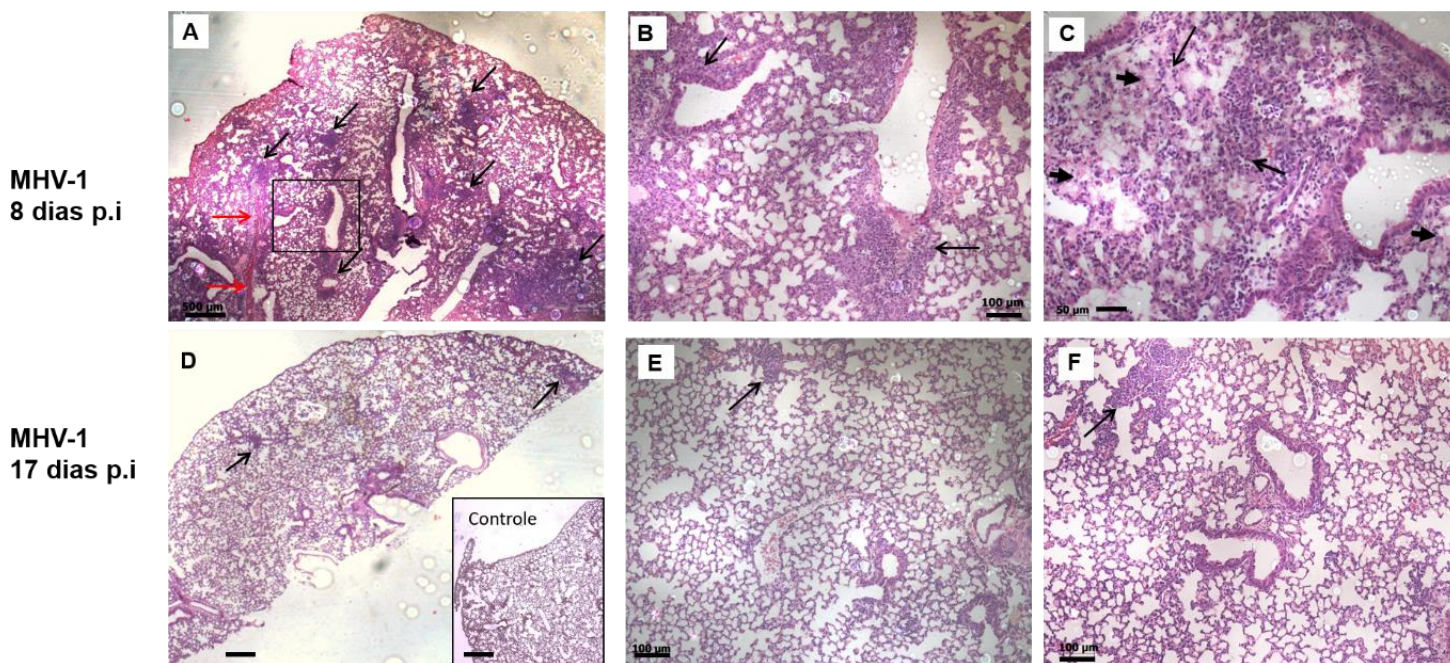


Figura 1. Cinética do desenvolvimento de pneumonia nos camundongos C57BL/6 infectados via intranasal, pelo vírus MHV-1 ($2,8 \times 10^5$ TCDI). Painéis **A**, **B** e **C** apresentam pulmão dos animais após 8 dias de infecção e **D**, **E** e **F** após 17 dias. Em **A** estão apresentados numerosos infiltrados celulares, pequenos e médios (setas pretas); extensa congestão arterial e capilar (setas vermelhas) sem lesão alveolar; área marcada pelo retângulo com aumento no painel **B**. O infiltrado celular intersticial difuso (setas pretas), com fluido seroso (cabeças de setas) em alguns alvéolos (**C**). No dia 17 p.i., observou-se diminuição de tamanho e número dos infiltrados inflamatórios (setas, **D**, **E**, **F**). Geralmente, o aspecto do tecido assemelhava-se ao dos animais não infectados (**Controle**). Barras de escala de 500 μm (**A**, **D** e **Controle**); de 100 μm (**B**, **E**, **F**); e de 50 μm (**C**).

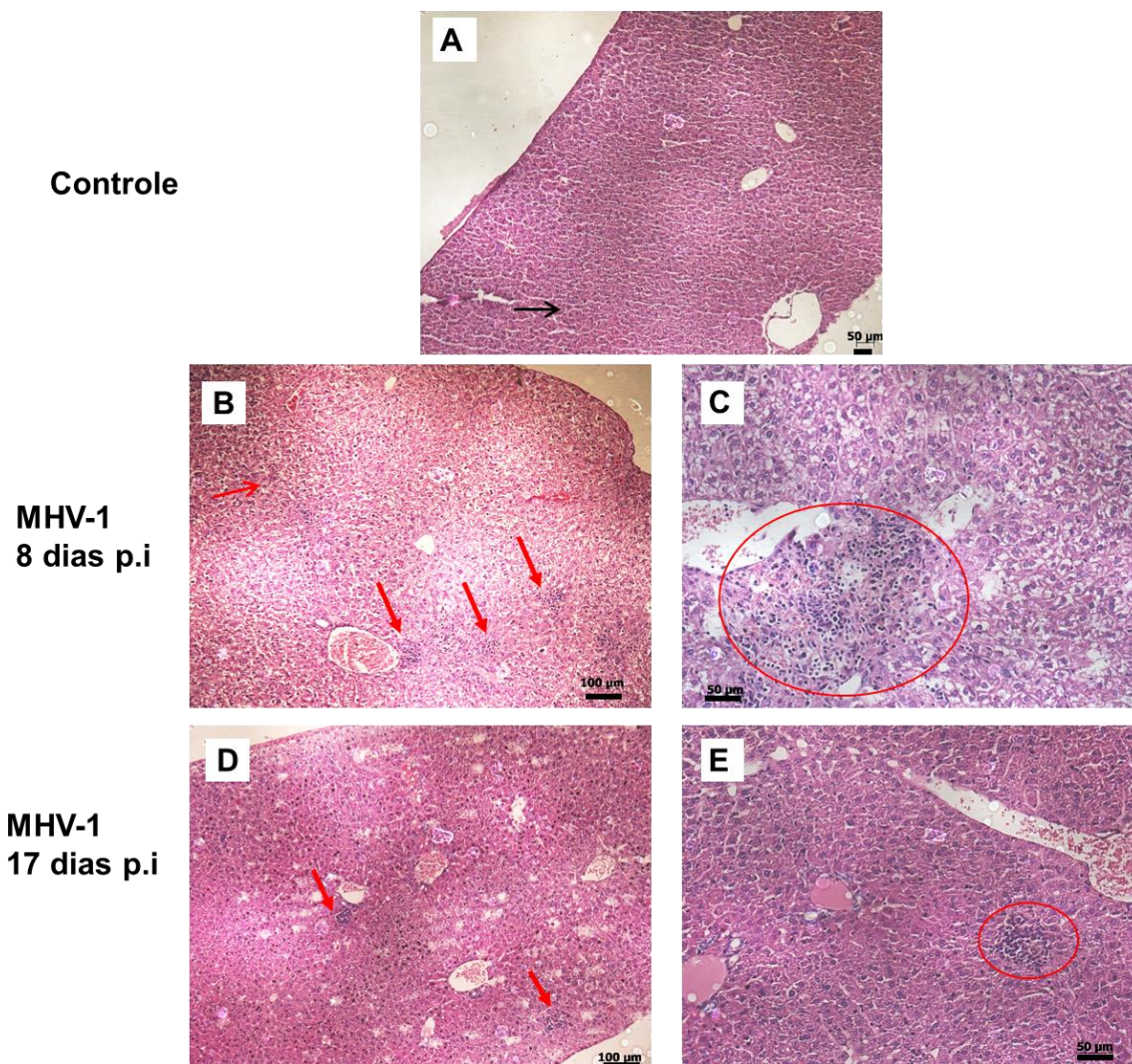


Figura 2. Histopatologia do fígado de camundongos C57BL/6 infectados, via intranasal pelo vírus MHV-1 ($2,8 \times 10^5$ TCDI). Após 8 dias de infecção, no parênquima do fígado foram observados pequenos e difusos infiltrados inflamatórios, marcados pelas setas em **B**, com aumento em **C**. No dia 17 p.i, tamanho e número dos infiltrados foram reduzidos (**D** e **E**). Barras de escala de 100 μm (**B** e **D**); de 50 μm (**A**, **C**, **E**).

5.2 Modelo de Síndrome respiratória aguda causado pelo MHV-1 em camundongos Balb/c *nude*

Os animais atímicos da linhagem Balb/c *nude* foram infectados pela mesma dose do MHV-1 ($2,8 \times 10^5$ TCDI). A histopatologia do pulmão e fígado foi analisada nos dias 8 e 17 p.i. A **figura 3** demonstra a histologia do pulmão dos animais infectados e não infectados (controle). No oitavo dia, camundongos *nude* apresentaram forte infiltração no parênquima pulmonar, principalmente, pelos leucócitos mononucleares (**Figura 3. B**), com lesão de pneumócitos alveolares e de células endoteliais, alteração do epitélio bronquiolar e congestão de vasos (**Figura 3.C, D**).

A pneumonia viral permaneceu até o dia 17 de infecção, com aumento da congestão capilar e de hemorragia, demonstrando infecção crônica no pulmão (**Figura 3. E, F**).

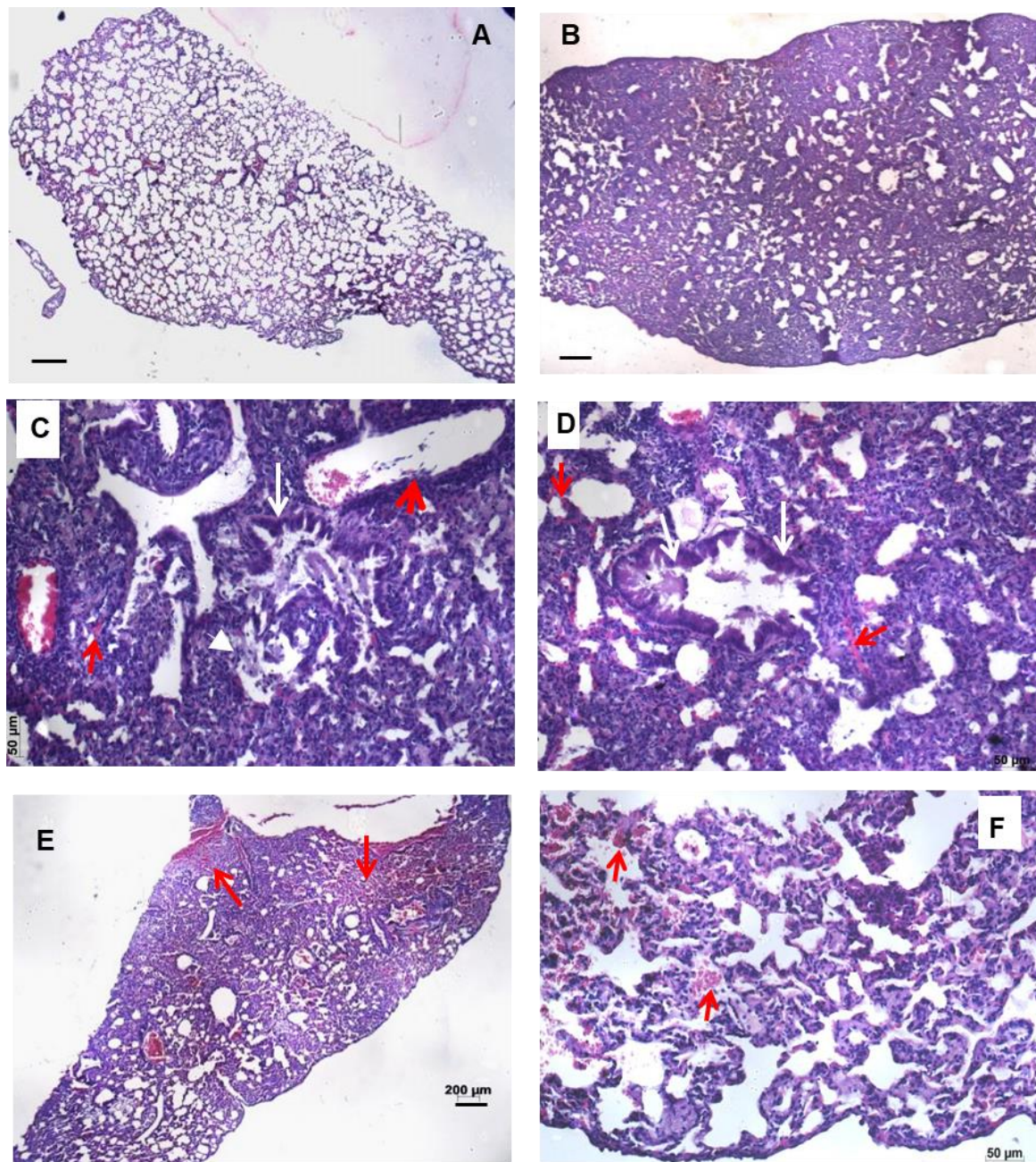


Figura 3. Cinética do desenvolvimento de pneumonia em camundongos nude infectados pelo vírus MHV-1. Painel **A** apresenta controle, não infectado. No dia 8 p.i, foram observados sinais de pneumonia viral intersticial difusa (**B, C e D**) com hiperplasia e lesão de pneumócitos alveolares (cabeça de seta branca); e forte infiltração intersticial com macrófagos e linfócitos. Bronquíolos com hiperplasia e dano epitelial (setas brancas). Endoteleite, lesão de células endoteliais, congestão em vasos (setas vermelhas). No dia 17 p.i, a infiltração celular do parênquima pulmonar permaneceu e aumentou a congestão capilar e hemorragia (**E e F**). Barras de escala de 200 μm (**A, C e E**); de 100 μm (**B**); de 50 μm (**D e F**).

Alterações histopatológicas observadas nos brônquios e alvéolos dos animais infectados estão demonstrados com maior resolução na **figura 4**, apresentando evidências de dano e morte do epitélio bronquiolar e infiltrado inflamatório em bronquíolos (**Fig.4 A, 4.B, 4.C**). Pneumócitos do epitélio alveolar lesados ou hipertróficos, *debris* e hemácias na luz alveolar, número elevado de macrófagos alveolares, compõe sinais de dano alveolar (**Fig.4 D, 4.E**). A histopatologia observada corresponde ao quadro histopatológico de broncopneumonia viral aguda. No dia 8 p.i foi observado início de fibrose intersticial, com aparência mixóide do tecido (**Fig.4 E**), que se intensificou com aumento do acúmulo de colágeno no dia 17 p.i, gerando o padrão histopatológico de pneumonia em organização (**Fig.4 F**). Crescimento do tecido conjuntivo corresponde ao reparo tecidual pulmonar causado pela injúria do epitélio alveolar induzida pelos vírus, com posterior descamação epitelial, exposição do tecido.

Várias marcas histopatológicas observadas na pneumonia causada pelo MHV-1 nos camundongos *nude* assemelham-se com a pneumonia causada pelo SARS-CoV-2 em humanos. A **Figura 5** demonstra, os principais elementos desta pneumonia: dano alveolar difuso (DAD), associado à morte e hiperplasia de pneumócitos do epitélio alveolar; edema e depósito de fibrina intra-alveolar; dano e descamação do epitélio brônquico; congestão capilar.

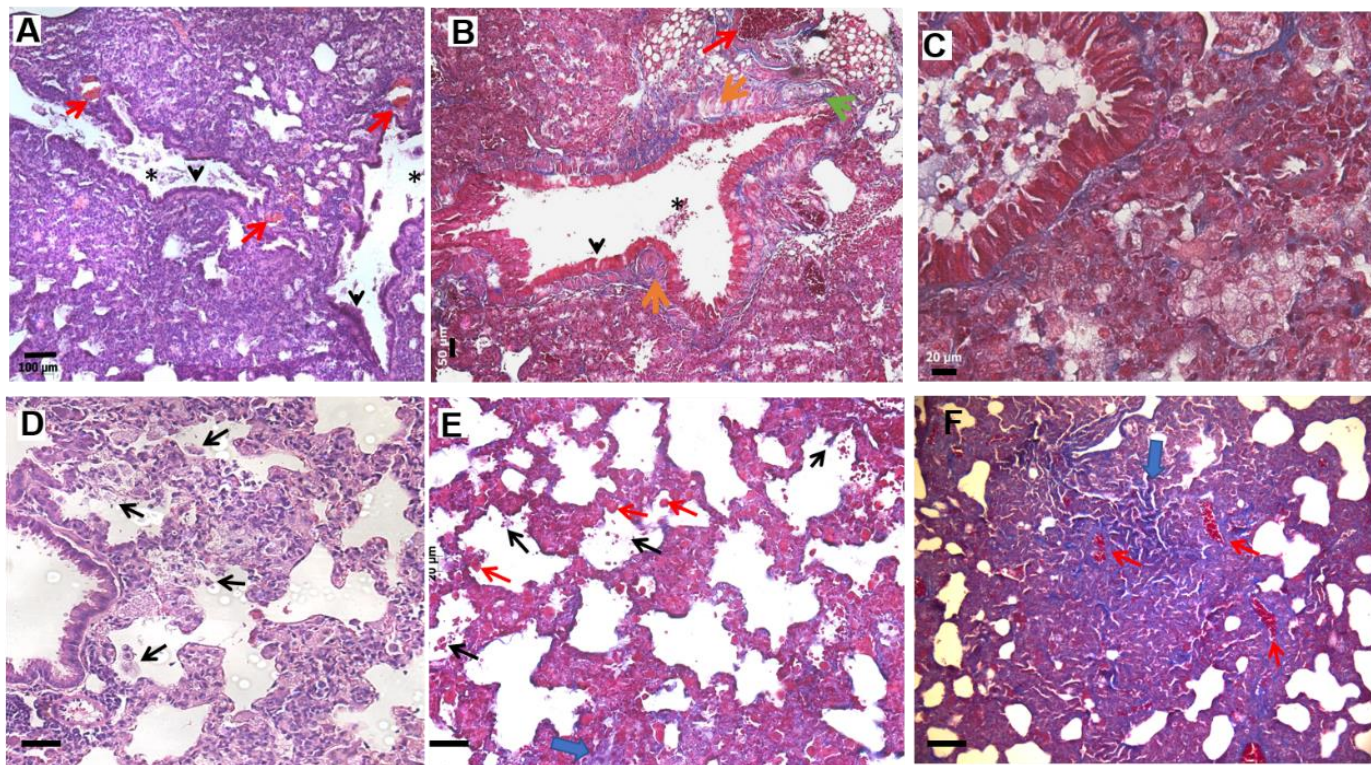


Figura 4. Alterações histopatológicas dos brônquios e alvéolos nos camundongos *nude* infectados pelo vírus MHV-1. Pulmões foram examinados nos dias 8 p.i (A-E) e 17 p.i (F). Cortes do tecido pulmonar foram corados por hematoxilina e eosina (A, D) e pela técnica de Masson, para coloração de colágeno (B, C, E, F). Brônquio em corte longitudinal (A e B), bronquíolo (C) e áreas alveolares (D, E, F). Em A e B, as células do epitélio bronquiolar estão sem cílios (cabeça de setas pretas), as células mortas descamadas na luz bronquiolar (*) e congestão dos vasos sanguíneos (setas vermelhas). Em B, a cartilagem (seta verde) e musculatura lisa (setas laranjas) estão presentes. Infiltrado celular inflamatório em bronquíolo (C). Nas painéis D, E e F, as paredes alveolares espessadas por infiltrado inflamatório linfomonocitário, com número elevado de macrófagos alveolares (setas vermelhas) e pneumócitos do epitélio alveolar lesados (setas pretas). Em E, início de fibrose intersticial, com aparência mixóide, azulado, do tecido (seta azul). Em F, pequenas artérias congestionadas (setas vermelhas) e aumento do acúmulo do colágeno nas áreas de pneumonia (seta azul) no dia 17 p.i. Barras de escala de 100 µm (A, D, E, F); 50 µm (B) e de 20 µm (C).

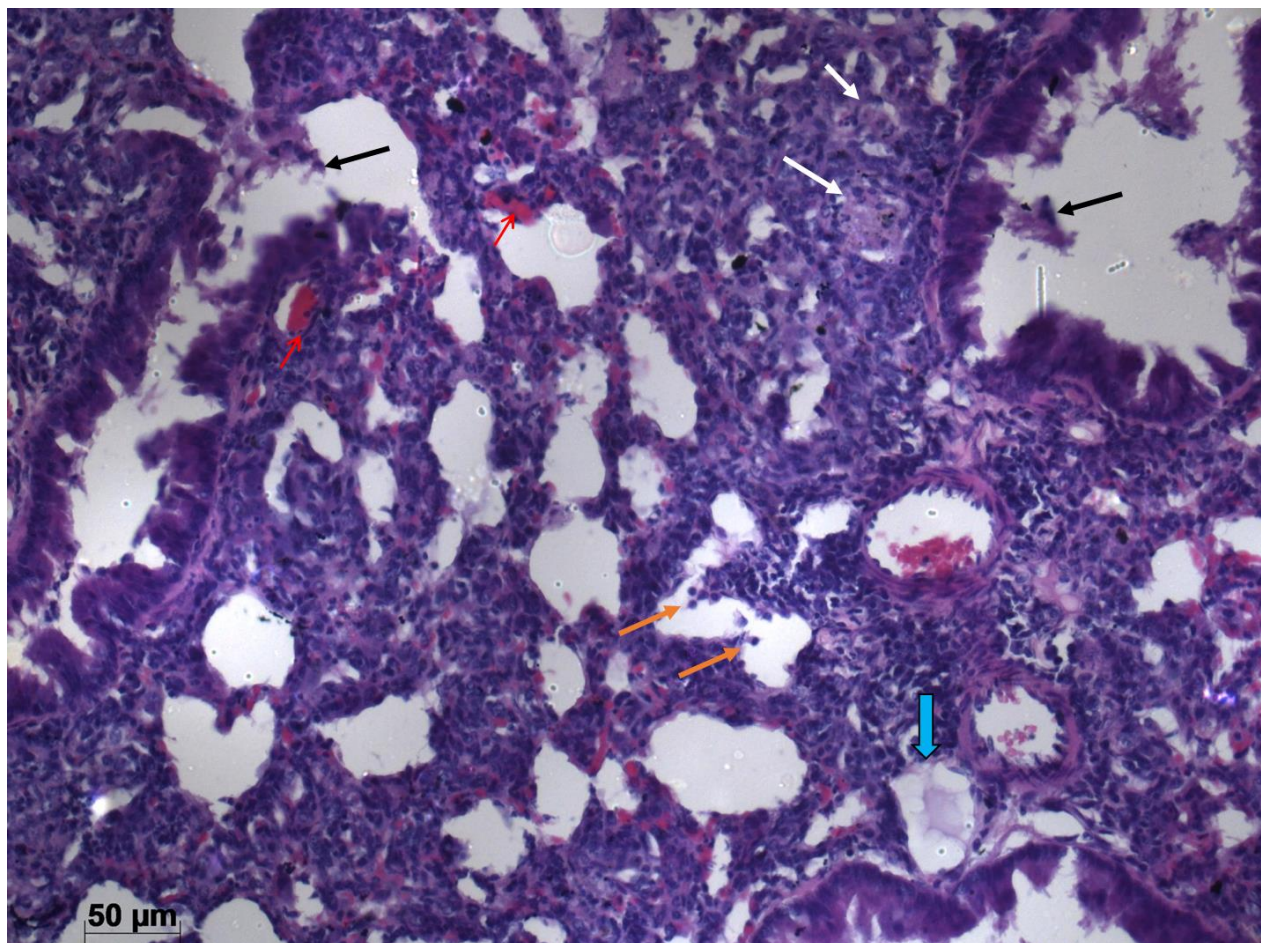


Figura 5. Características histopatológicas pulmonares da infecção por MHV-1 em camundongos (8 d.p.i) compartilhadas com a pneumonia e dano alveolar difuso associada ao COVID-19: Tumificação intersticial associada a infiltração de células inflamatórias; edema (seta azul) ou tampões de fibrina intra-alveolar (setas brancas); hiperplasia de pneumócitos tipo 2 (setas laranja); dano e descamação do epitélio brônquico (setas pretas); vasos e congestão capilar (setas vermelhas).

O fígado de camundongos *nude*, também foi afetado pela infecção do vírus MHV-1, apresentando pequenos infiltrados inflamatórios, compostos por leucócitos mononucleares, que diferentemente dos animais C57BL/6, aumentaram ao longo dos dias de infecção (**Figura 6.B, 6.C**). No dia 17 p.i, estes infiltrados aumentaram em tamanho e número no parênquima e em volta dos vasos sanguíneos. Adicionalmente, verificamos a patologia induzida no fígado de animais mais jovens, de 4 semanas de vida, sabidamente mais suscetíveis à infecção, em comparação com os animais adultos (de 6 a 8 semanas) utilizados nos nossos experimentos. Como foi esperado, os animais muito jovens apresentaram patologia exacerbada, com numerosos infiltrados

de células inflamatórias, áreas de hemorragia e morte necrótica de hepatócitos (**Figura 6.D, 6.E**).

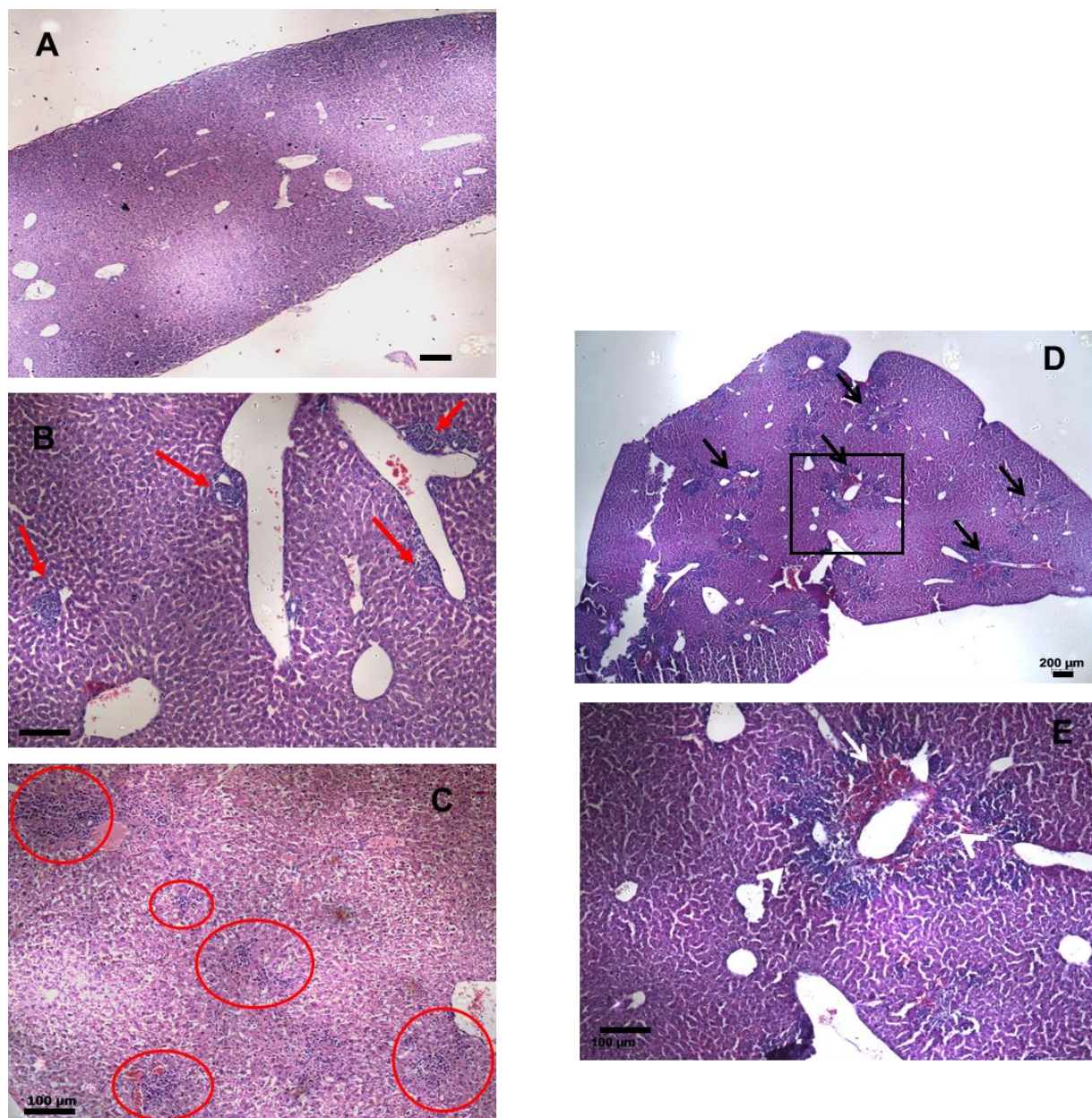


Figura 6. Histopatologia do fígado dos camundongos *nude* infectados pelo vírus MHV-1. Histopatologia do fígado dos camundongos adultos de 8 semanas de idade, examinada nos dias 8 (**B**) e 17 p.i. (**C**), em comparação com os animais não infectados (**A**). Setas vermelhas indicam, pequenos infiltrados inflamatórios no parênquima (**B**), que aumentaram após 17 dias de infecção (**C**). Painéis **D** e **E** apresentam histopatologia em animais de 4 semanas de idade, após 8 dias de infecção. Setas pretas indicam numerosos infiltrados (**D**). Área marcada pelo retângulo esta apresentada em **E** com aumento, demonstrando hemorragia (seta branca) e hepatócitos necróticos (cabeças de setas brancas). Barras de escala de 500 μm (**A**); 200 μm (**D**) e de 100 μm (**B, C, E**).

Os resultados histopatológicos obtidos em camundongos *nude* demonstram que, a doença induzida pelo vírus MHV-1 reproduz as principais características da pneumonia viral induzida nos pacientes com COVID-19 e, além disso, promove a disseminação do vírus ao fígado, induzindo a patologia que pode agravar o prognóstico da doença. Este modelo pode ser considerado como o modelo de Síndrome respiratória aguda grave (SARS) observado em casos severos da COVID-19. Diferentemente dos animais *nude*, os camundongos C57BL/6 apresentaram maior resistência à infecção pelo MHV-1 e demonstraram capacidade de recuperação da pneumonia e inflamação hepática a partir do dia 8 p.i. Este modelo pode ser considerado como o modelo de doença observada em casos moderados da COVID-19. Na segunda etapa deste trabalho, ambos os modelos de infecção viral foram utilizados para os experimentos de coinfeção pelo *M. tuberculosis* e MHV-1.

5.3. Impacto da coinfeção pelo vírus MHV-1 no curso da tuberculose experimental induzida em camundongos C57BL/6 e Balb/c *nude*

Os camundongos foram infectados, via intratraqueal, com baixa dose de infecção (100 bacilos), pela cepa laboratorial Mtb H37Rv, de virulência moderada, que causa tuberculose amena, de progressão lenta, no modelo pré-estabelecido em animais da linhagem C57BL/6 (RIBEIRO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017). No dia 28 p.i, quando o sistema imune do hospedeiro pode controlar o crescimento de Mtb, por meio da formação de granulomas no pulmão, os animais foram coinfectados pelo MHV-1 e monitorados durante adicionais 17 dias. A morbidade induzida nos animais pela infecção bacteriana, viral ou pela coinfeção, foi monitorada pela observação de sinais clínicos de doença, mudança comportamental dos animais e pela quantificação do peso corporal e do pulmão, dos animais infectados.

Não foram observadas mudanças comportamentais ou casos de morte, nos grupos de animais C57BL/6 (BL/6), nem em Balb/c *nude*, durante o período de experimentação. Os dados de monitoramento do peso corporal apresentados na **Figura 7**, demonstram que a infecção dos camundongos BL/6 pelo Mtb ou pelo vírus, não alterou o peso durante o período de observação. No grupo dos animais

coinfectedos foi observada um tendência a diminuição do peso corporal a partir do dia 8 p.i (Fig. 7.A).

Nos camundongos *nude*, a infecção pelo Mtb causou redução do peso corporal somente no dia 45 p.i. Não foi observada alteração do peso dos animais pela infecção viral. No grupo dos animais coinfectedos pelo vírus, foi observada redução significativa do peso ($P < 0,05$), após 8 dias de infecção pelo vírus, que foi cerca de 20% menor em comparação com o peso inicial e 25% menor que o maior peso obtido (no dia 28 p.i.), o que demonstra desenvolvimento de doença severa nos animais deste grupo (Fig. 7.B).

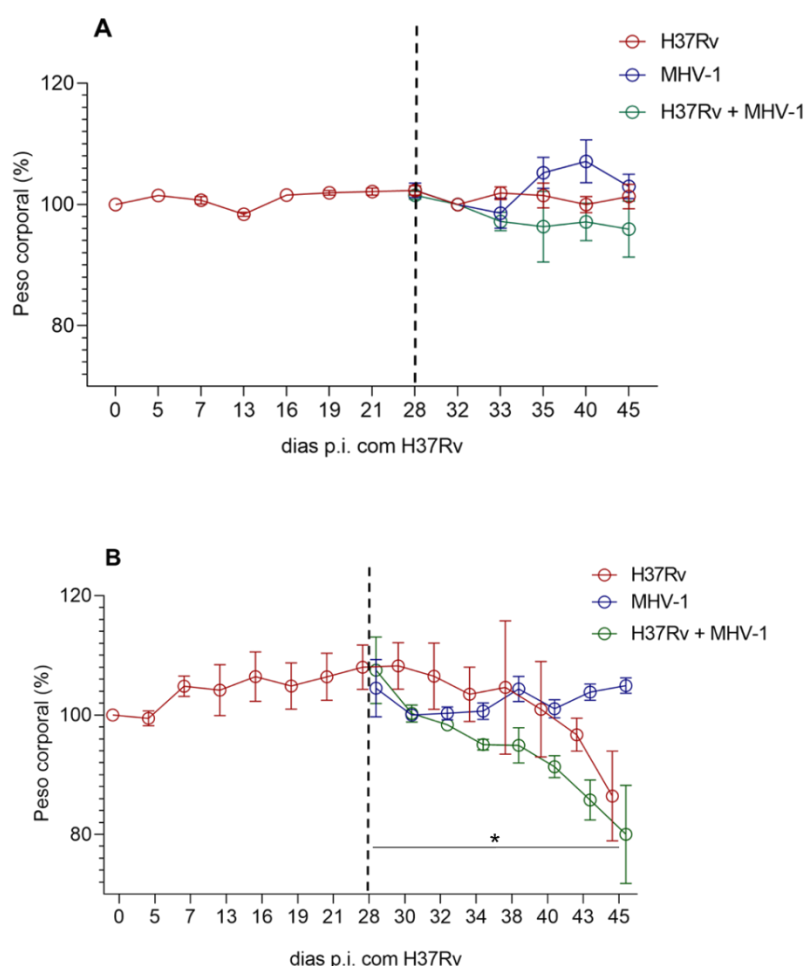


Figura 7. Monitoramento do peso corporal de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfeção pelo Mtb e vírus. Grupos de camundongos C57BL/6 (A) ou Balb/c *nude* (B) foram infectados por via intratraqueal com 100 bacilos da cepa Mtb H37Rv e no dia 28 p.i. (marcado no gráfico pela linha pontilhada) foram coinfectedos com $2,8 \times 10^5$ TCDI do MHV-1, via intranasal e monitorados por 17 dias. Os grupos dos animais infectados apenas pelo Mtb ou pelo MHV-1 foram utilizados como controles. A perda de peso corporal foi utilizada como indicador de morbidade. Os dados foram apresentados em relação à porcentagem do peso corporal inicial, de cada animal antes da infecção. Os valores foram relatados como média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças foram consideradas significativas de acordo com * $P < 0,05$.

Também foi avaliada a cinética do peso do pulmão e da carga bacteriana nos animais infectados. Como demonstrado na **Figura 8.A**, o peso do pulmão dos camundongos BL/6 infectados, somente pela cepa H37Rv, foi maior em comparação aos animais não infectados, mas permaneceu estável durante os dias de experimento. A infecção pelo MHV-1 não alterou o peso pulmonar significativamente. A coinfeção dos animais com Mtb e MHV-1, aumentou ligeiramente o peso do pulmão no dia 8 após infecção viral; entretanto, após 17 dias, não foi observada diferença significativa entre o peso do pulmão nos grupos infectados.

Os camundongos *nude* infectados somente pela cepa Mtb apresentaram no dia 28 p.i, peso do pulmão maior em comparação aos animais não infectados, e o peso permaneceu estável neste grupo durante todo experimento. A infecção pelo MHV-1 aumentou ligeiramente o peso pulmonar dos animais no dia 8 p.i, em comparação aos animais não infectados, que foi maior no grupo dos animais coinfectados, entretanto a diferença diminuiu, posteriormente.

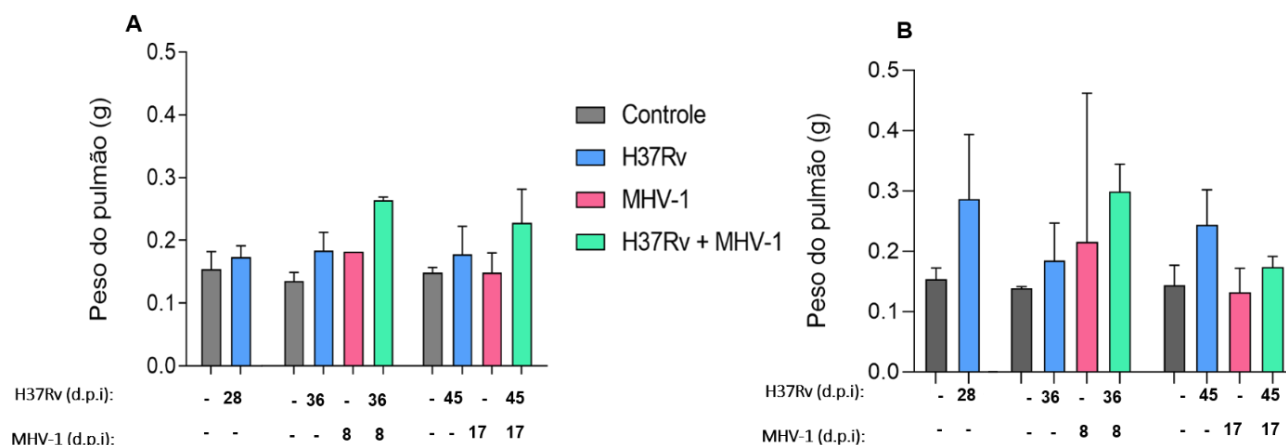


Figura 8. Quantificação do peso do pulmão de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfectados. Os camundongos C57BL/6 (**A**) e *nude* (**B**) foram infectados como indicado na legenda da **Fig.7**. O peso pulmonar de cada animal, nos grupos infectados e não infectados (Controle) foi medido após 28, 36 e 45 dias de infecção pelo Mtb, e nos dias 8 e 17 após infecção viral. Os valores foram relatados como média \pm DP.

Em relação à carga bacteriana pulmonar, medida nos animais infectados pelo Mtb pelo teste bacteriológico, esta foi mantida no pulmão dos camundongos BL/6, durante o período de observação, no nível próximo de Log5 (**Figura 9.A**). Foi

observada redução de, aproximadamente 1 log, do número de bactérias no dia 36 p.i, indicando que animais dessa linhagem foram capazes de controlar a infecção. A co-infecção dos camundongos BL/6 pelo vírus MHV-1, não alterou significativamente a capacidade desses animais de controlar a infecção pelo Mtb.

A carga bacteriana no pulmão dos camundongos *nude*, infectados pelo Mtb durante 28 dias foi cerca de 1,5 Log maior que nos animais da linhagem BL/6 (**Figura 9.B**). Entre dias 36 e 45 p.i, foi observado crescimento significativo de CFU no pulmão, ($P < 0,0001$). No grupo dos animais coinfecados pelo vírus MHV-1, também foi observado aumento significativo de carga bacteriana entre dias 36 e 45 p.i ($P < 0,001$).

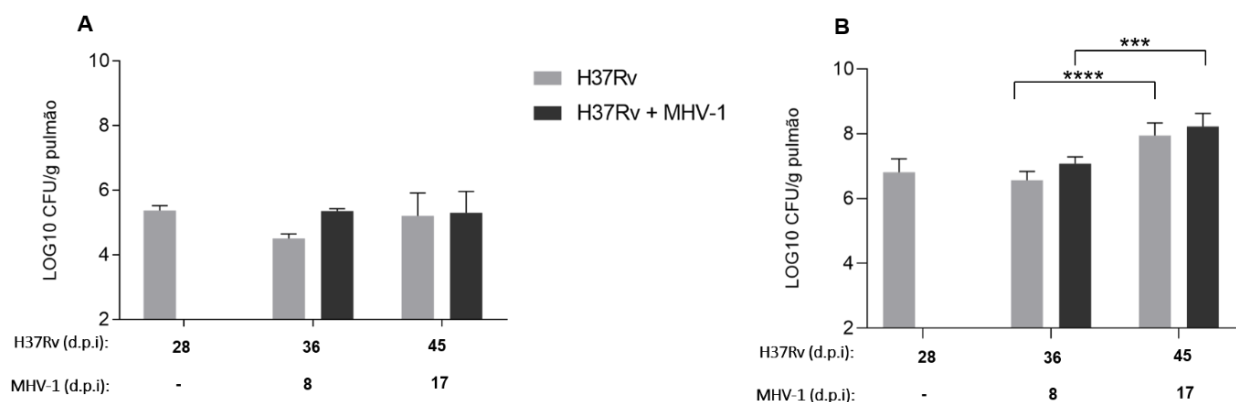


Figura 9. Carga bacteriana nos pulmões de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfecados. Os camundongos C57BL/6 (**A**) e Balb/c *nude* (**B**) foram infectados como foi indicado na legenda da **Fig.7**. As cargas bacterianas nos pulmões foram avaliadas por CFU. Os dados foram obtidos em dois experimentos independentes com 6 camundongos em cada grupo: 2 a 3 animais por ponto. Os valores foram relatados como média \pm DP. Os valores médios que foram significativamente diferentes são indicados por asterisco **** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$.

5.4. Impacto da coinfecção pelo vírus MHV-1 e *M. tuberculosis* na histopatologia do pulmão e fígado de camundongos C57BL/6 e *nude*

Em camundongos C57BL/6, a infecção pela cepa H37Rv induziu progressão lenta da patologia no pulmão. Após 36 dias de infecção, pode-se observar escassos e pequenos granulomas, principalmente em volta de vasos sanguíneos e bronquíolos, caracterizados por infiltração celular densa (**Fig. 10.A**), que tiveram pequeno aumento, até dia 45 p.i (**Fig. 10.E**). Nos animais BL/6 coinfecados, durante 8 dias (**Fig. 10 C**, **10.D**), foi observado agravamento da inflamação pulmonar, em comparação ao grupo infectado apenas pelo vírus MHV-1 (**Fig. 10.B**). O agravamento foi associado ao

aumento da infiltração difusa do parênquima pelos leucócitos e aumento de líquido nos alvéolos e bronquíolos (**Fig. 10D**).

Nos animais BL/6 coinfetados durante 17 dias (**Fig. 10.G e 10.H**), observou-se diminuição do exsudato líquido nos alvéolos, mas áreas do infiltrado celular com aspecto granulomatoso expandiram (**Fig 10.G**, setas pretas), sugerindo que os sinais de pneumonia viral diminuíram em comparação aos achados do dia 8 (**Fig. 10.D**), entretanto, foi observado aumento da patologia causada pela micobacteria (granulomas), com aparecimento de áreas de fibrose (**Fig. 10.H**).

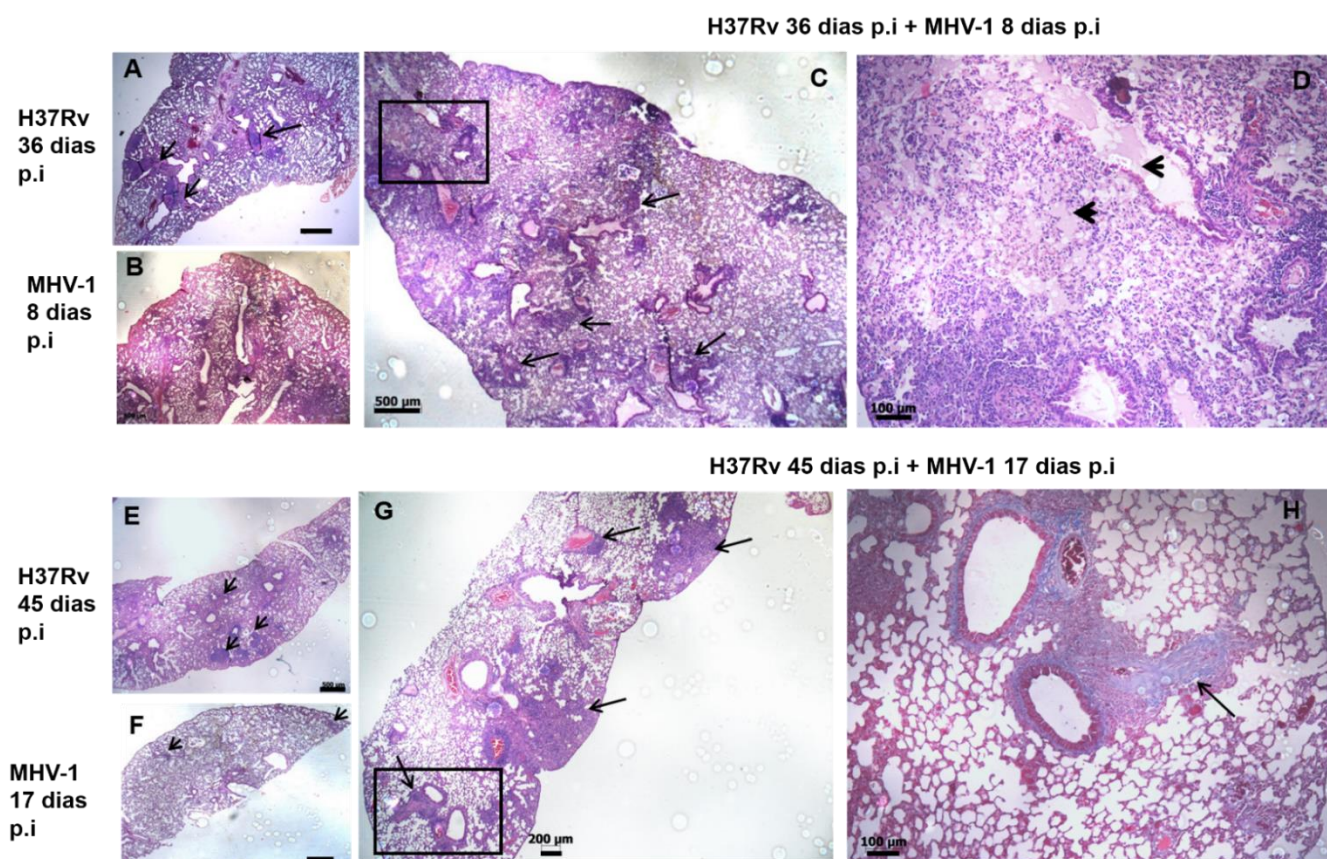


Figura 10. Modelo de coinfeção por *M. tuberculosis* e coronavírus MHV-1 em camundongos C57BL/6. **(A)** Camundongos infectados apenas com a cepa *Mtb* H37Rv exibiram no dia 36 p.i. pequenos e escassos granulomas (setas pretas). **(B)** Animais infectados apenas com o MHV-1, no dia 8 p.i. apresentaram numerosos infiltrados celulares, pequenos ou médios, com líquido seroso em alguns alvéolos. **(C)** Camundongos coinfetados durante 8 d.p.i: granulomas indicados pelas setas. Uma região representativa, marcada pelo retângulo em **C**, esta ampliada no **D**, demonstrando aumento das áreas com exsudato seroso e celular (cabeças das setas). **(E)** Após 45 d.p.i por *Mtb*, foi observado maior número de granulomas (setas) em comparação com deste em 36 d.p.i. **(A)**. **(G)** Em animais co-infectados pelo MHV-1 durante 17 d p.i., área marcada pelo retângulo e ampliada em **H**, apresenta fibrose em alguns dos granulomas (**H**, coloração de Masson). Barras de escala de 100 μ M (**D e H**); 500 μ M (**A, B, E, F**) e de 200 μ M (**G**).

A histopatologia do fígado de camundongos BL/6 esta apresentada na **figura 11**. Os animais infectados somente pelo vírus MHV-1, apresentaram pequenos e difusos infiltrados de células inflamatórias no dia 17 p.i (**Figura 11.A e 11.B**). Animais infectados pela cepa H37Rv durante 45 d.p.i (**Fig.11.C, 11.D**) e animais coinfectedos (**Fig.11.E, 11.F**) exibiram, principalmente em volta dos vasos, infiltrados mais compactos, pequenos, mas em maior quantidade, comparado aos animais infectados apenas pelo vírus. (**Fig. 11.A, 11.B**).

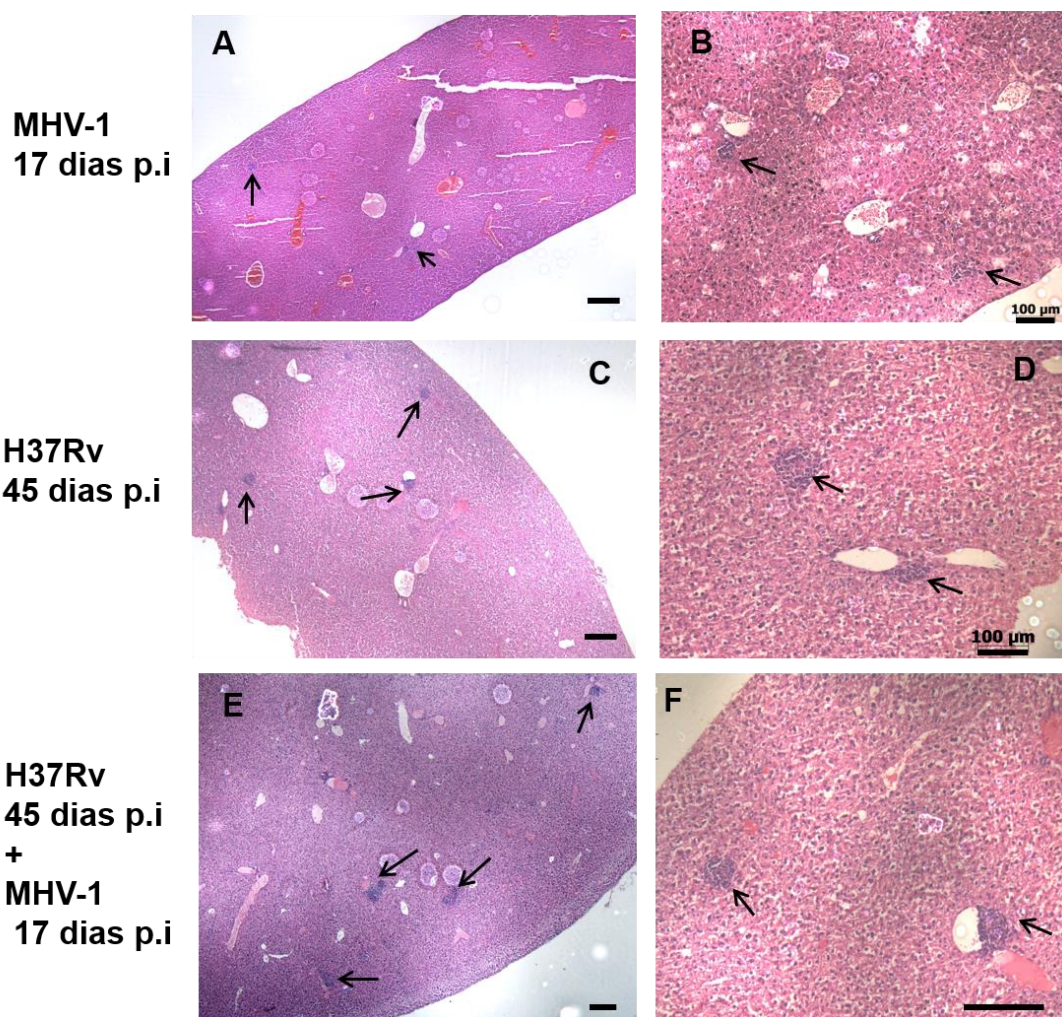


Figura 11. Histopatologia do fígado dos camundongos C57BL/6 coinfectedos pelo Mtb H37Rv e MHV-1. (**A e B**) Infecção pelo MHV-1 durante 17 dias induz formação dos pequenos infiltrados linfo-monocitários, difusos (setas). (**B e C**) Animais infectados pelo Mtb durante 45 dias, exibiram infiltrados pequenos, mais compactos (setas). (**E e F**) Nos animais coinfectedos, os infiltrados (setas) foram similares aos observados em **B e C**. Barras de escala de 500 μm (**A, C e E**), de 100 μm (**B, D e F**).

A histopatologia induzida nos camundongos *nude* está apresentada na **Figura 12** (pulmão), **Figura 13** (fígado) e **Figura 14** (rim). Como esperado, os animais atímicos (*nude*) apresentaram agravamento da patologia, comparado aos camundongos C57BL/6.

No pulmão, animais infectados somente com a cepa H37Rv exibiram no dia 45 p.i (**Fig. 12.A**) lesões granulomatosas, sem sinais de necrose, compostas por macrófagos (epiteliais e espumosos) e poucos linfócitos na periferia do infiltrado. A pneumonia induzida pelo MHV-1, no dia 17 p.i está apresentada na **Figura 12.B**. Quando coinfectedos nesse mesmo período (**Fig. 12.C, 12.E e 12.F**), os animais apresentaram desenvolvimento de necrose caseosa nas lesões, com aspecto granulomatoso da TB, caracterizadas por infiltração celular mais densa (**Fig. 12.C**, setas pretas), que não foram observadas nos animais apenas infectados pelo Mtb (**Fig. 12.A**). Nos granulomas aumentou a presença de neutrófilos (**Fig. 12.E**). Os mesmos camundongos, também apresentaram sinais histopatológicos da pneumonia viral, com infiltração intersticial difusa (**Fig. 12.D**), assim como observado no grupo somente infectado pelo MHV-1 (17 d.p.i) (**Fig. 12.B**).

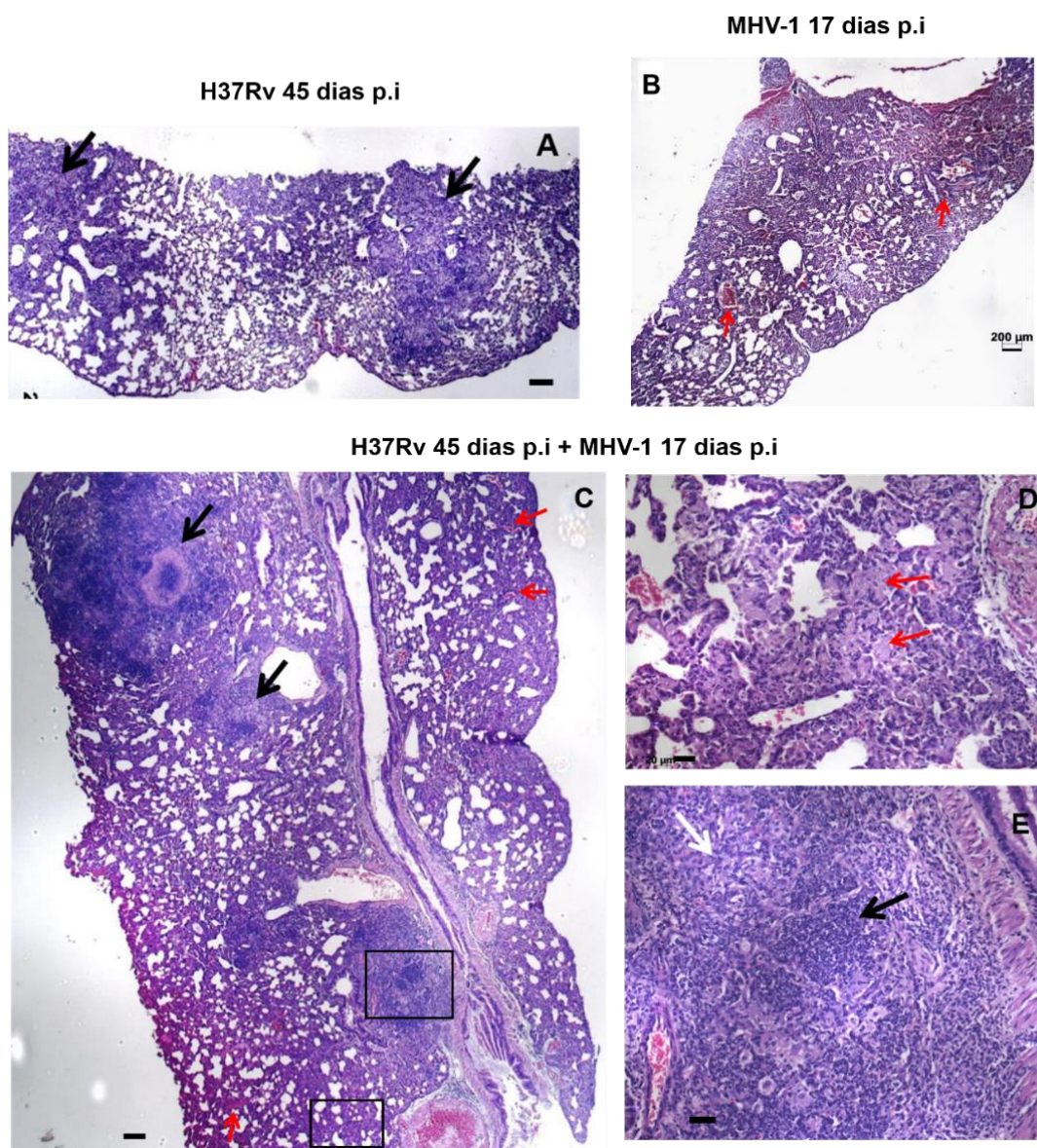


Figura 12. Modelo de coinfeção por *M. tuberculosis* e coronavírus MHV-1 em camundongos Balb/c *nude*. **A.** Camundongos infectados somente com a cepa Mtb H37Rv exibiram no dia 45 p.i. as lesões granulomatosas sem sinais de necrose (setas pretas). **B.** Camundongos infectados somente com o MHV-1, no dia 17 p.i. apresentaram pneumonia viral intersticial com infiltração pelas células inflamatórias, dano alveolar difuso e pequenos vasos sanguíneos congestionados (setas vermelhas). **C.** Camundongos coinfectados, apresentaram pneumonia viral com a infiltração celular intersticial difusa (setas vermelhas) e exibiram agravamento de patologia nas lesões granulomatosas, com infiltração celular mais densa e desenvolvimento das áreas de necrose caseosa (setas pretas). **D.** Ampliação da região referente a pneumonia viral (marcado pelo retângulo menor em **C**), demonstra espaços alveolares, compostos por macrófagos espumosos e fibrina (setas vermelhas). **E.** Ampliação da região do granuloma (marcado pelo retângulo maior em **C**), demonstra as áreas compostas pelos macrófagos (seta branca) e pelos neutrófilos (seta preta). Barras de escala de 200 µm (**A**, **B** e **C**); de 50 µm (**E**); e de 20 µm (**D**).

No fígado de camundongos *nude*, a infecção pelo MHV-1 induziu a formação de pequenos infiltrados linfo-monocitários no dia 17 p.i (**Fig. 13.A**). A infecção pela cepa Mtb H37Rv levou a formação de alguns granulomas, após 45 dias de infecção (**Fig. 13.B**). A coinfeção aumentou o número dos infiltrados celulares inflamatórios (**Fig. 13.C, 13.D**), comparado ao grupo somente infectado pelo MHV-1 (**Fig. 13.A**). Nos animais coinfectados, também observou-se áreas com depósito de colágeno, que foram corados em azul pela coloração de Masson (**Fig. 13.E**) e a presença de micobactérias BAAR, pela coloração Ziehl-Neelsen (**Fig. 13.F**).

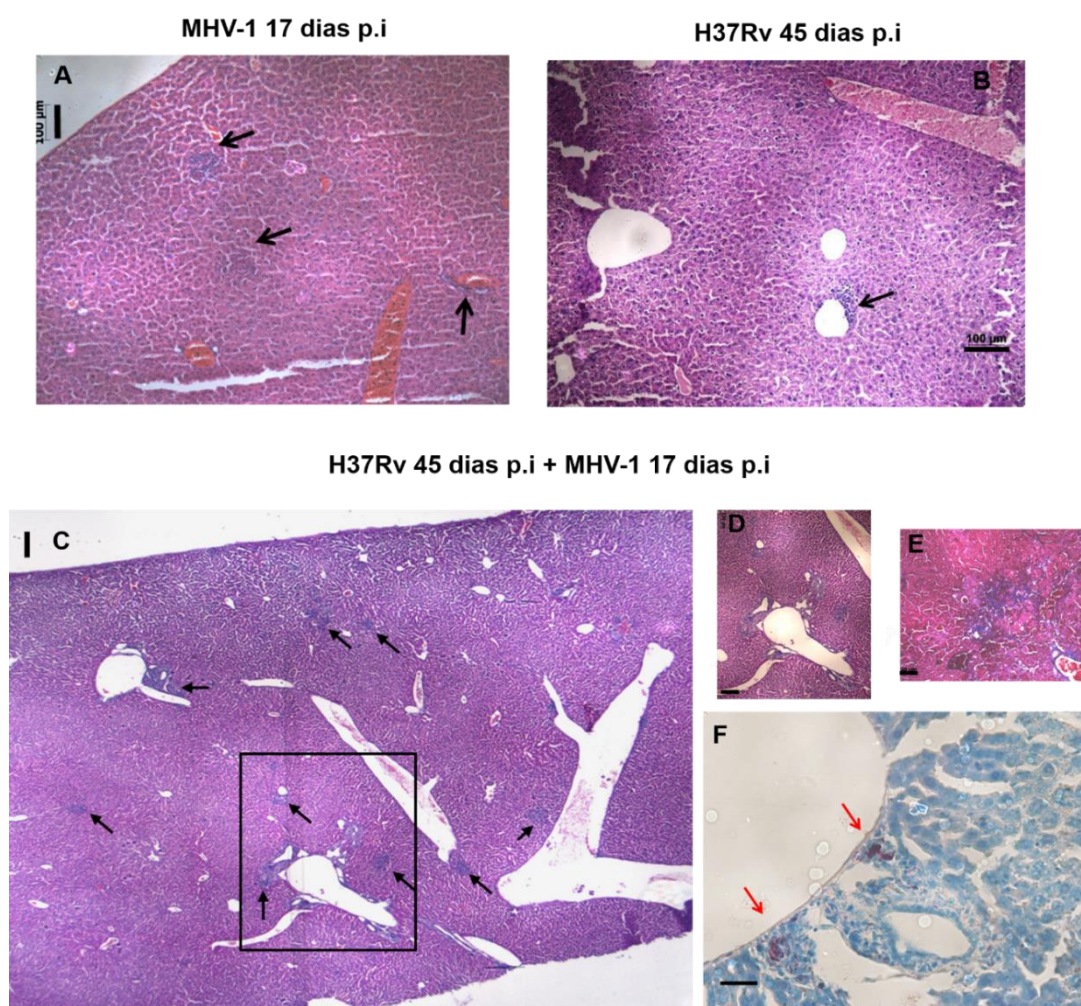


Figura 13. Histopatologia do fígado de camundongos *nude*, coinfectados pelo Mtb e MHV-1. (A) Fígado infectado durante 17 dias pelo MHV-1: infiltrados linfo-monocitários em volta de vasos sanguíneos e parênquima (setas pretas). (B) Escassos granulomas foram observados nos animais infectados pelo Mtb no dia 45 p.i. Em animais coinfectados (C - F), o número de pequenos infiltrados aumentou. A região marcada pelo retângulo está aumentada em D. Em E, áreas com depósito de colágeno (coloração de Masson). F. Presença de micobactérias, BAAR exibidas pela coloração de Ziehl-Neelsen (setas vermelhas). Barras de escala de 100 µm (A, B e D), de 200 µm (C), de 50 µm (E), de 20 µm (F).

Rins de camundongos BL/6 e *nude* utilizados nos experimentos deste trabalho, também foram coletados para análise histopatológica. A patologia foi observada somente no grupo dos animais *nude* coinfectedados, após 17 dias de infecção viral, que está apresentada na **Figura 14**. Em comparação ao grupo controle (**Figura 14.A e 14.C**), os animais coinfectedados apresentaram: dilatação dos túbulos proximais e distais, com restos proteináceos presentes na luz de túbulos; e dilatação e congestão em capilares peritubulares. Os glomérulos apresentaram alterações no aumento do espaço urinário de Bowman, que se localiza entre a cápsula de Bowman e o glomérulo e está associado ao encolhimento de alças capilares (**Fig 14.D**, setas brancas).

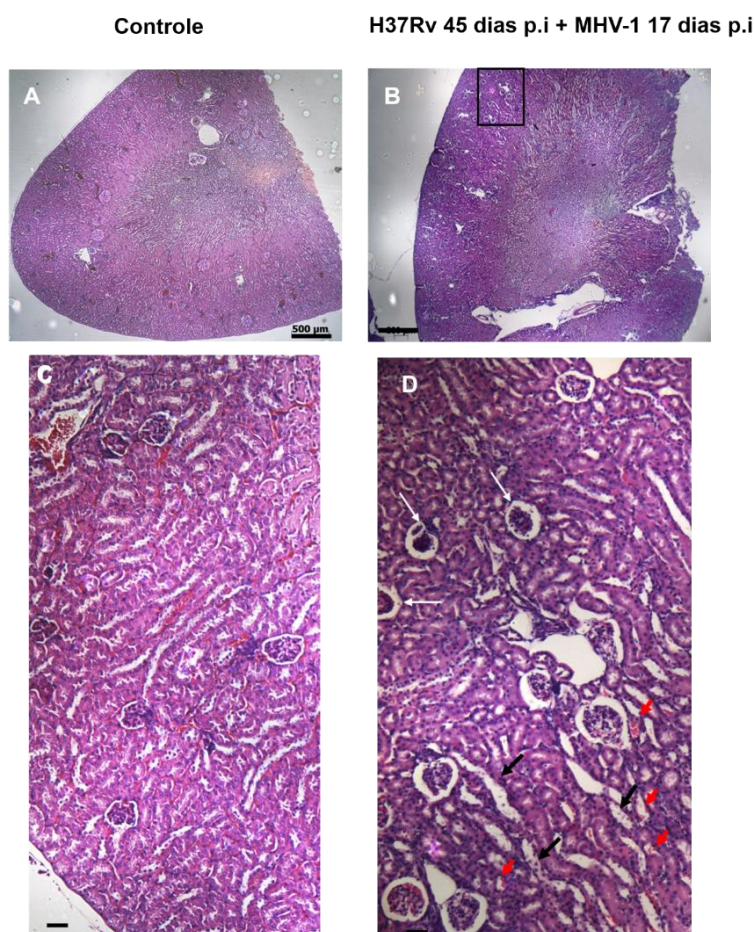
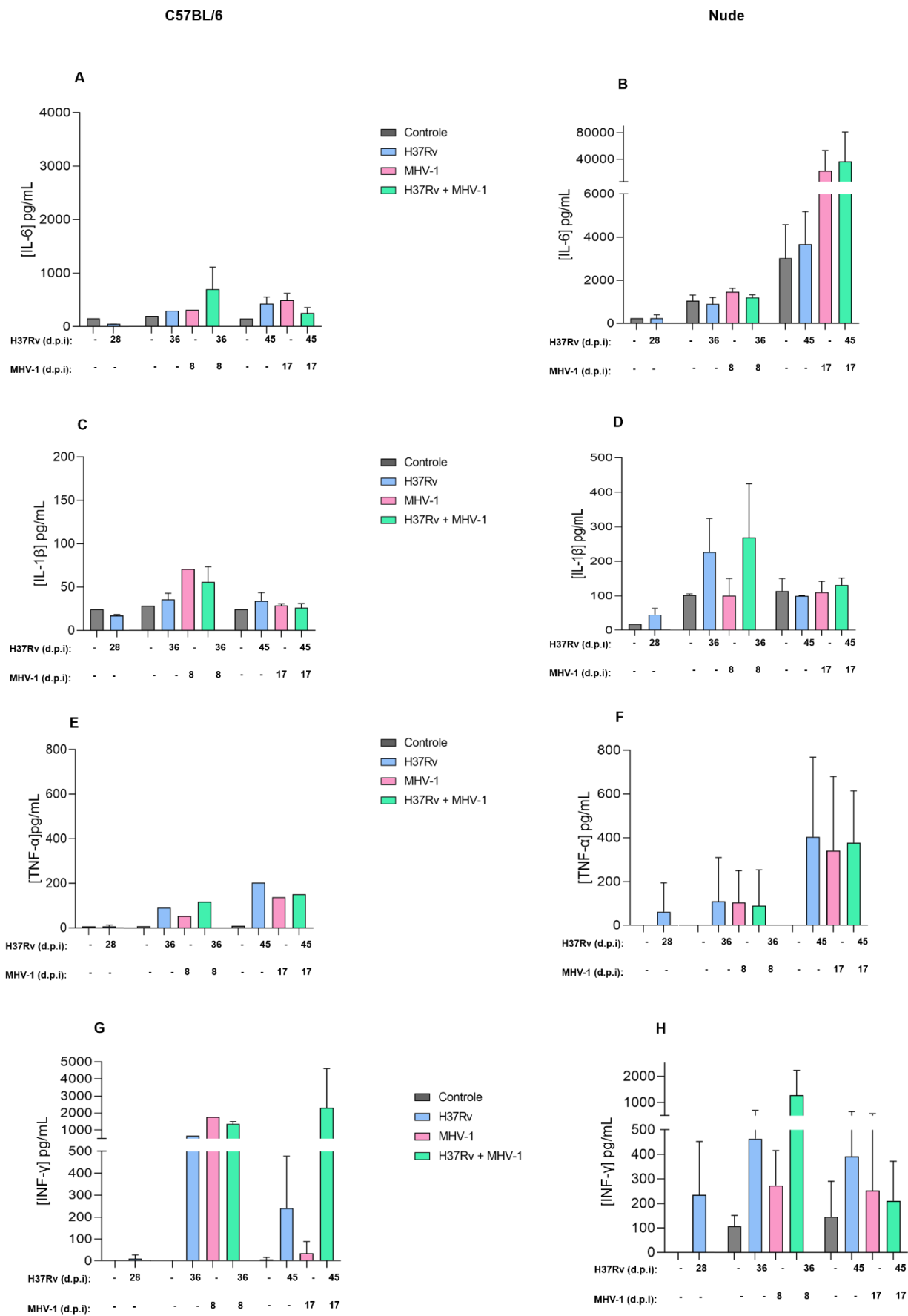


Figura 14. Histopatologia do rim de camundongos Balb/c *nude* infectados pelo Mtb H37Rv e vírus MHV-1. Os camundongo (**A e B**, controle) de 8 semanas de idade foram infectados como descrito na legenda da Figura 3. Após 17 dias de infecção viral (**B** com aumento da área marcada pelo retângulo em **D**), dilatação dos túbulos proximais e distais ou túbulo coletor, com alguns *debris* presentes nos túbulos (setas pretas); dilatação dos capilares peritubulares (setas vermelhas). Em glomérulos observou-se aumento do espaço urinário do Bowman, associado ao encolhimento de alças capilares (setas brancas). Barras de escala de 500 μm (**A e B**); e de 50 μm (**C e D**).

5.5. Impacto da coinfeccção pelo vírus MHV-1 e *M. tuberculosis* na produção de citocinas no pulmão dos camundongos C57BL/6 e Balb/c *nude*

O perfil de mediadores inflamatórios produzidos, pelas células pulmonares dos animais infectados por Mtb ou vírus está associado, ao nível de ativação das subpopulações celulares presentes no foco inflamatório do pulmão. Deste modo, avaliamos a produção de citocinas pelas células pulmonares, a partir do sobrenadante da cultura, *ex vivo* de células do pulmão, por 48 horas. A produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória e na indução da resposta imune protetora: IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias), IL-10 (citocina anti-inflamatória e reguladora negativa da resposta imune) foram quantificadas por meio do ensaio de ELISA sanduíche; e o mediador inflamatório óxido nítrico (NO) foi avaliado pelo método de Griess. Os resultados estão apresentados na **Figura 15**.



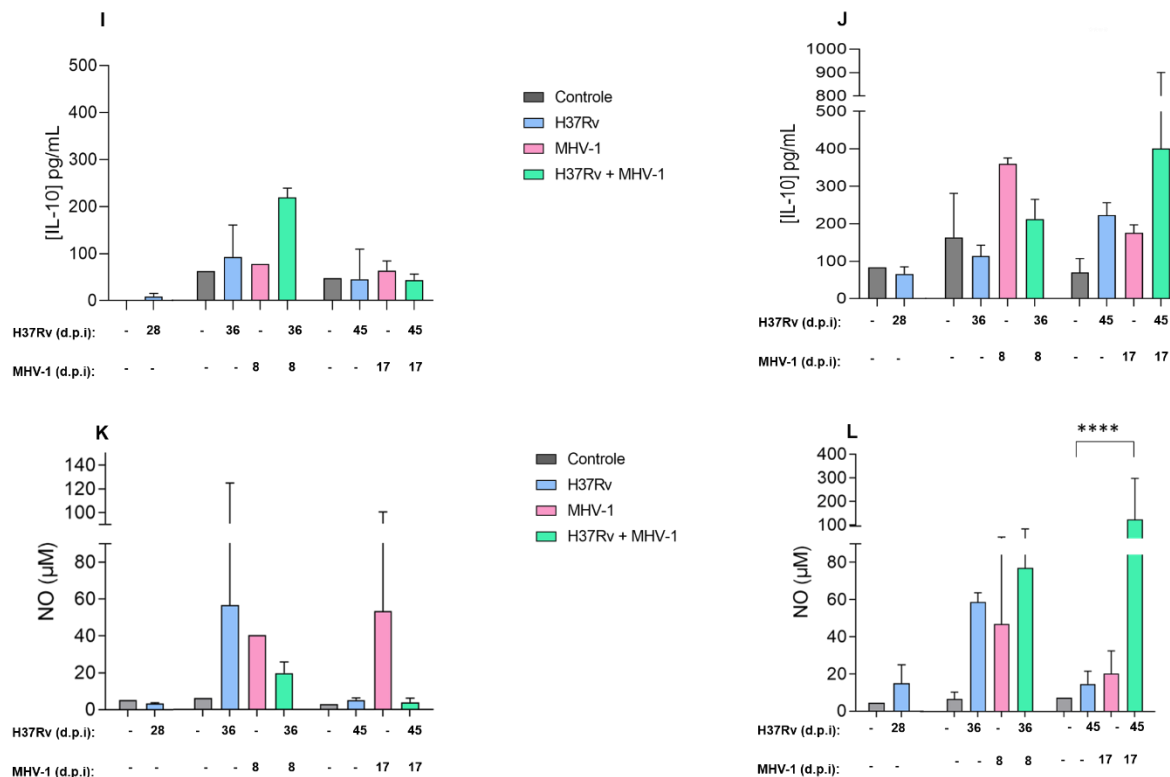


Figura 15. Análise da produção de citocinas no sobrenadante da cultura de células pulmonares de camundongos após infecção com cepa Mtb H37Rv, vírus MHV-1 ou coinfeção pelo Mtb e vírus. Os camundongos BL/6 e *nude* foram infectados como foi indicado na legenda da Fig.4. As células do pulmão foram cultivadas em cultura por 48h. Os sobrenadantes da cultura foram utilizados para quantificação de citocinas: IL 6 (A, B), IL-1 β (C, D), TNF- α (E, F), IFN- γ (G, H), IL-10 (I, J), através do método de ELISA utilizando kits específicos, e do óxido nítrico (K, L) utilizando método de Griess. Os valores foram relatados como média \pm DP. Os valores médios que foram significativamente diferentes são indicados por asteriscos * P < 0,05, ***P < 0,001, ****P < 0,0001.

A análise de produção de citocinas do pulmão dos camundongos (Fig. 15) demonstra que, a produção dos mediadores pró-inflamatórios nos camundongos *nude* foi em geral maior que nos animais BL/6, o que foi esperado, uma vez que animais atímicos são mais suscetíveis às infecções pelo patógenos intracelulares, como o Mtb ou vírus. Assim, a produção de citocinas, induzida pela infecção do Mtb, nos animais BL/6 foi relativamente baixa e permaneceu estável, durante o período do experimento; entretanto, apresentou redução da produção de IFN- γ e NO, após 36 d.p.i. Este perfil de citocinas reflete a capacidade das células do sistema imune de controlar a infecção e inflamação no pulmão através de produção equilibrada das citocinas pró e anti-inflamatórias, entretanto, sem eliminação da bactéria. Da mesma forma, a infecção pelo

MHV-1 foi capaz de induzir a produção das citocinas pró-inflamatórias no dia 8 p.i., mas no dia 17 p.i., a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IFN- γ) diminuiu. Não foi observado aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias nos camundongos coinfectedos, comparando com animais infectados somente pelo Mtb; entretanto, a redução na produção de IFN- γ observada no último grupo no dia 17 p.i., não foi observada nos animais coinfectedos.

Já nos camundongos *nude*, a produção das citocinas pró-inflamatórias foi maior tanto na infecção pelo Mtb, quanto pelo vírus, apresentando tendência de aumento progressivo, na produção de IL-6 e TNF- α ao longo do experimento, que foi cerca de 4-5 vezes maior na data final. Alta produção dessas citocinas foi observada no grupo dos animais coinfectedos também, entretanto o nível de produção não foi maior que nos animais infectados somente pelo MHV-1. Forte produção de IL-1 β foi observada nos camundongos infectados pelo Mtb e nos coinfectedos no dia 36 p.i, que posteriormente reduziram no dia 45 p.i. Nos animais coinfectedos, a produção de IL-1 β foi induzida pela microbateria, uma vez que a infecção pelo vírus não induziu a produção da IL-1 β nos animais *nude*. Interessantemente, animais *nude* (atímicos) foram capazes de produzir níveis intermediários de IFN- γ durante todo período do experimento. Além disso, no grupo dos animais coinfectedos houve produção, particularmente alta do mediador inflamatório NO, que apresentou aumento, cerca de 2 vezes, no final do experimento. Os animais *nude* infectados pelo MHV-1 e coinfectedos produziram altas concentrações de IL-10, que foram maiores, comparadas aos animais infectados somente pelo Mtb.

O maior nível de produção de todas as citocinas estudadas, nos camundongos *nude* (com exceção de IFN- γ) foi associado à maior severidade da doença, observada nestes animais em comparação com camundongos BL/6.

5.6. Composição celular do infiltrado inflamatório do pulmão de camundongos Balb/c *nude* infectados por *M. tuberculosis* e MHV-1

Para aprofundar o estudo da patogenia de doença pulmonar grave observada nos animais *nude* infectados por *M. tuberculosis*, MHV-1, ou coinfectedos, realizou-se o estudo da composição celular do infiltrado inflamatório extraído do pulmão de

camundongos Balb/c *nude*, com foco nas células inflamatórias mielóides. As células analisadas do pulmão, foram isoladas no dia 17 p.i da infecção pelo MHV-1, no dia 45 p.i da infecção pelo Mtb e na data final do experimento de coinfeção. Elas foram tratadas pelos corantes do kit, que permite discriminar células vivas e mortas (L/D kit); e por anticorpos específicos aos marcadores de células hematopoiéticas (CD45) e das principais subpopulações das células mielóides. As células foram fixadas com paraformaldeído e submetidas a citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na **Figura 16**.

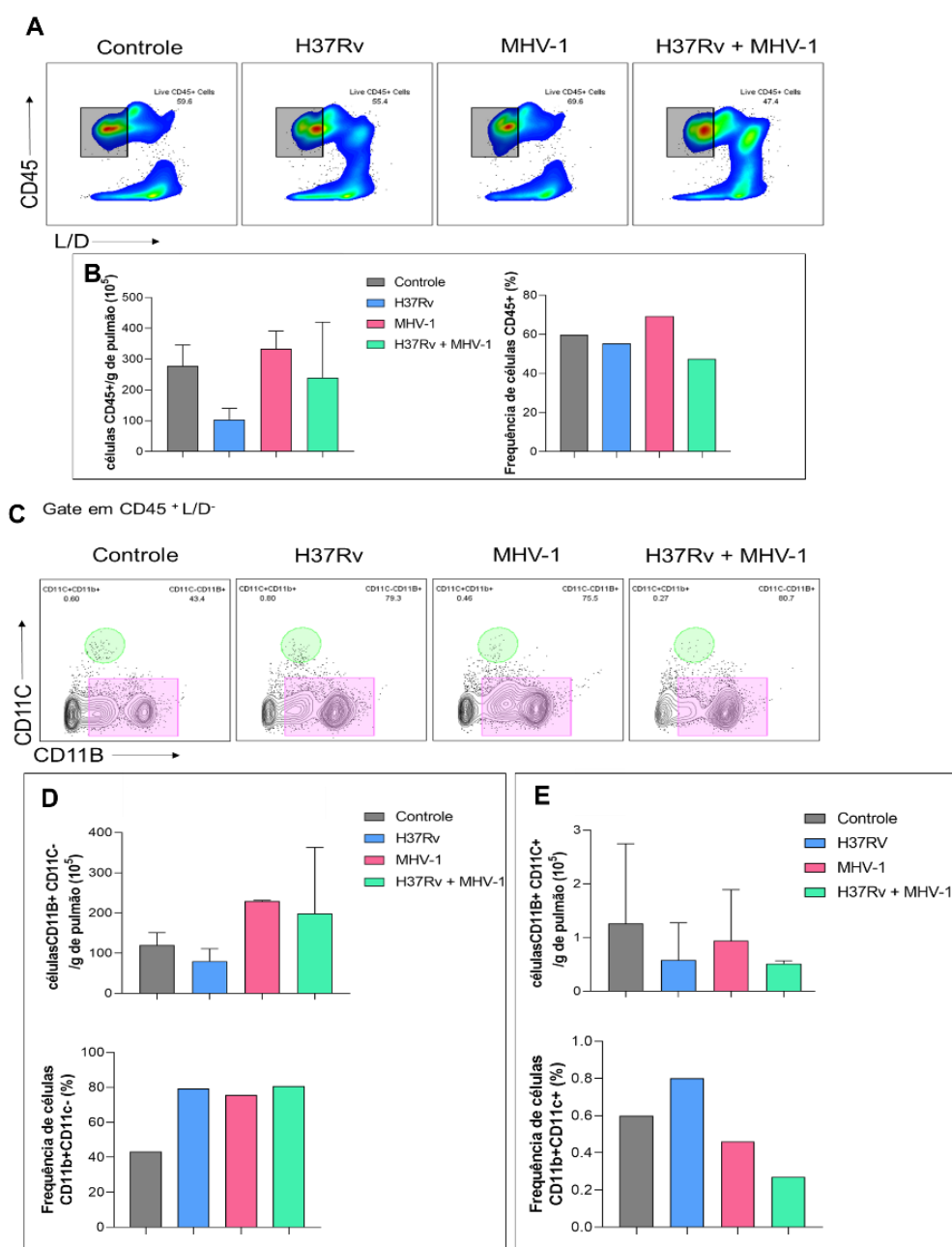
A análise da população das células hematopoiéticas CD45+ vivas nos pulmões dos animais, demonstra que a frequência dessas células foi ligeiramente diminuída, nos animais infectados pelo Mtb e nos coinfectados, comparadas aos grupos controle e infectados pelo MHV-1 (**Fig. 16.B**). Essa diminuição, aparentemente, foi associada ao aumento de células mortas, cuja população aumentou no histograma (**Fig. 16.A**). Apesar de animais coinfectados apresentarem mais células CD45+ mortas, o número absoluto das células vivas CD45+ foi maior em comparação ao controle, devido ao maior acúmulo das células hematopoiéticas no pulmão dos animais deste grupo. Em números absolutos, a diminuição das células CD45+ foi maior nos animais infectados pela cepa Mtb H37Rv (**Fig. 16.B**).

A frequência da população de células mielóides CD11b⁺ entre as células hematopoiéticas aumentou em todos os grupos infectados, comparado ao controle não infectado (**Fig. 16.D**). O número absoluto das células CD11b⁺CD11c⁻ foi cerca de duas vezes maior nos grupos de camundongos infectados apenas pelo MHV-1 e dos coinfectados, comparadas aos grupos controle e animais infectados pelo Mtb (**Fig. 16.D**). Dentro da população de leucócitos CD45+, também foi analisada uma população menor de células CD11b^{low}CD11c⁺ (**Fig. 16.C**), que inclui as células dendríticas. Esta população foi reduzida nos animais coinfectados, tanto em frequência, quanto em número de células (**Fig. 16.E**).

Dentre as células positivas CD11b, foram identificadas sub-populações das células CDLy6C⁺CDLyG⁻ (monócitos/macrófagos) e células CDLy6C⁻CDLyG⁺ (neutrófilos) (**Fig. 16.F**). A população dos monócitos aumentou significativamente, nos pulmões dos animais infectados pelo MHV-1 e nos coinfectados (**Fig. 16.G**). O número

dessas células mais que dobrou na infecção viral em comparação ao controle. O aumento, também foi observado nos animais coinfectados.

A população de neutrófilos, nos pulmões, foi maior que a população dos monócitos, em todos os grupos e aumentou ainda mais pós infecção (**Fig. 16.H**). O aumento foi maior em animais infectados pelo MHV-1 e nos coinfectados. Em números absolutos a presença dos neutrófilos não aumentou nos animais infectados somente pelo H37Rv. O aumento foi expressivo em animais infectados pelo MHV-1 (cerca de 3 vezes), e ainda maior em animais coinfectados (cerca de 4 vezes).



F Gate em CD45⁺ CD11B⁺

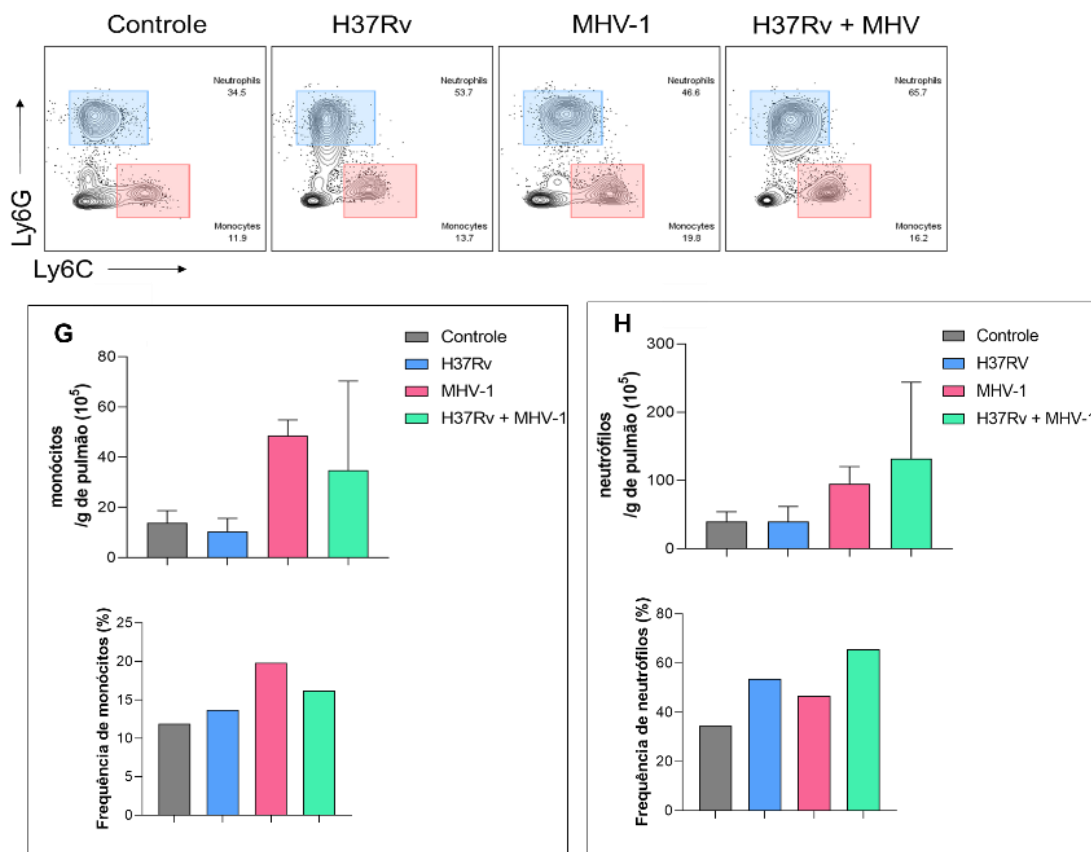


Figura 16. Análise do perfil celular inflamatório do pulmão de camundongos Balb/c *nude*. Células do pulmão foram isoladas, contadas e analisadas por citometria de fluxo. **A**. População de leucócitos do pulmão (CD45⁺) analisadas dentro do gate de células vivas. Em **B**, população de células CD11b⁺ e células CD11c⁺ (**C**) analisadas dentro da população CD45⁺. Em **D** Subpopulação de monócitos do pulmão e **E** subpopulação de neutrófilos, analisadas entre as células CD11b⁺.

6. Discussão

O objetivo geral deste trabalho, foi avaliar os efeitos da infecção por coronavírus na patogenia da tuberculose experimental. Para isso, primeiramente, estabelecemos modelos de infecção viral em camundongos susceptíveis (Balb/c *nude*) e resistentes (C57BL/6), com o intuito de reproduzirmos patologias similares à Síndrome Respiratória Aguda grave ou moderada, respectivamente.

A infecção intranasal pelo coronavírus MHV-1 ($2,8 \times 10^5$ TCDI), em camundongos C57BL/6 (BL/6), após 8 dias, foi capaz de causar pneumonia intersticial viral, com infiltrados inflamatórios focais. A infecção viral, também disseminou para o fígado, que exibiu escassos e pequenos infiltrados difusos no parênquima e perto dos vasos sanguíneos. Entretanto, com 17 dias de infecção, esses animais apresentaram sinais

de recuperação, com redução de tamanho e número das áreas infiltradas. Trabalhos anteriores demonstraram resultados similares, que camundongos BL/6 são capazes de eliminar o MHV-1 durante 10 dias, de acordo com ensaios de placa (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). O modelo de infecção viral em animais resistentes, apresentou-se similar à maioria dos casos de pacientes de COVID-19, que são capazes de eliminar o vírus em poucas semanas. O vírus infecta, primeiramente, o trato respiratório superior em humanos, e muitas vezes não chega a causar infecção pulmonar, ou induz a pneumonia leve e transitória. Somente em casos severos de COVID-19, a pneumonia viral progride, causando Síndrome respiratória aguda grave (SARS) e em alguns pacientes: Lesão Pulmonar Aguda (LPA)/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e/ou Lesão e falência de múltiplos órgãos (rins, fígado, coração, sistema nervosa), com alta taxa de mortalidade neste último caso (LOPES-PACHECO *et al.*, 2021). As principais características histopatológicas observadas *post-mortem* em casos fatais da COVID-19, durante autópsia estão apresentados na **Tabela 2** e as características que foram observadas nos nossos experimentos, em camundongos BL/6 ou *nude* foram indicadas.

Tabela 2. Principais características histopatológicas, causadas pelo coronavírus SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19 fatal, ou pelo MHV-1 nos camundongos Balb/c *nude* ou C57BL/6, infectados experimentalmente. (*) Elementos de histopatologia e frequência (%) de observações da autópsia de 21 pacientes com COVID-19 (de acordo com Menter et al., 2020). (**) Animais BL/6 apresentaram pneumonia intersticial focal. (***) Somente os animais *nude* jovens, de 4 semanas de idade, apresentaram alterações necróticas. (NF) - não feito.

Órgão	Características histopatológicas	%(*) COVID-19	Balb/c <i>nude</i>	C57BL/6
Pulmão	Congestão capilar pulmonar	100	+	+
	DAD exudativa	76	+	-
	DAD proliferativa	38	+/-	-
	Pneumócitos reativos e células sincitiais	52	+/-	-
	Microtrombos em capilares alveolares	45	+	-
	Broncopneumonia difusa	29	-	-
	Broncopneumonia focal	19	+	-(**)
	Traqueíte mucosa grave	29	NF	NF
	Enfisema	29	-	-
	Embolia pulmonar	19	-	-
	Infiltrados linfóides proeminentes	14	+	+
	Hemorragia pulmonar	14	+	-
	Amiloidose de vasos pulmonares	14	-	-
	Vasculite	5	+	-
Fígado	Esteatose	41	-	-
	Necrose de choque	29	-(***)	-
Rim	Dano tubular agudo	93	+	-
	Coagulação intravascular disseminada	18	-	-
	Nefropatia hipertensiva	12	-	-
	Nefropatia diabética	12	-	-

Dessa forma, o modelo de infecção MHV-1 em camundongos resistentes (BL/6), apresentado neste trabalho, reproduziu a doença respiratória aguda moderada, caracterizada pela pneumonia viral intersticial, com sinais de disseminação leve da infecção para o fígado e recuperação da patologia nos tecidos após duas semanas de infecção; associada à sobrevivência dos animais. Entretanto, recentemente foram descritos modelos de COVID-19 alternativos, baseados na mesma abordagem de infecção de camundongos pelo vírus de hepatite murino, que reproduzem doença respiratória aguda fatal. No modelo de Andrade e colaboradores (2021), também foram utilizados camundongos BL/6, mas os animais foram infectados por uma cepa mais virulenta, MHV-3, que possui tropismo para o sistema nervoso central (ANDRADE *et al.*, 2021). Neste trabalho, o vírus induziu doença respiratória transitória, com patologia pulmonar moderada e comprometimento funcional do pulmão; e posteriormente levou à inflamação sistêmica, lesão múltipla de órgãos (fígado, cérebro,

rins, coração e testículos), causando morte dos animais após uma semana de infecção. Da mesma forma, a utilização do vírus MHV-1, para infecção dos camundongos de linhagem mais suscetível A/J, levava os animais à morte entre 7 a 12 dias (PAIDAS *et al.*, 2021). Foi observada pneumonia viral severa, associada aos eventos vasculares e celulares generalizados, em diferentes órgãos, com ampla disseminação do vírus, desenvolvimento de hepatite fulminante, inflamação aguda no cérebro, coração e rins. Os autores destes dois recentes trabalhos concluíram que, os modelos desenvolvidos recapitularam com sucesso a doença grave observada em pacientes com COVID-19, principalmente destes que faleceram por falência múltipla de órgãos.

Dados epidemiológicos demonstram que, várias comorbidades associadas à imunodeficiência da imunidade celular (câncer, AIDS) agravam a severidade da COVID-19 nos pacientes (LOPES-PACHECO *et al.*, 2021). Portanto, neste trabalho avaliamos a patogenia induzida pelo vírus MHV-1 em camundongos imunodeficientes, comparado com os animais BL/6. Camundongos atímicos (Balb/c *nude*) foram infectados igualmente aos animais BL/6, via intranasal com $2,8 \times 10^5$ TCDI de MHV-1. Diferentemente dos BL/6, animais *nude* apresentaram quadro de broncopneumonia viral aguda, após 8 dias de infecção. Como esperado, por se tratar de animais imunodeficientes, esses animais compartilharam mais marcas histopatológicas similares à COVID-19 grave, comparada aos camundongos resistentes (**Tabela 2**). Animais *nude* desenvolveram vários elementos histopatológicos da Síndrome respiratória aguda grave (SARS), tais como: dano alveolar difuso, hemorragia, fibrose intersticial, lesão do epitélio broncoalveolar. Apesar do comprometimento mais grave do pulmão, nenhum animal morreu durante o período de experimentação, nem apresentou redução significativa do peso corporal, mesmo exibindo agravamento da patologia, com 17 dias de infecção viral. Assim como em camundongos BL/6, infecção viral em camundongos susceptíveis, também se disseminou para o fígado, com indução de infiltrados inflamatórios. Entretanto, este grupo apresentou piora da patologia ao longo de infecção, com aumento dos infiltrados no dia 17 p.i. Diferentemente dos camundongos adultos (6-8 semanas), utilizados na maioria dos experimentos, os camundongos *nude* mais jovens, de 4 semanas de idade (ainda lactentes), apresentaram grave patologia no fígado com áreas de necrose e morte de hepatócitos,

após infecção pelo vírus MHV-1. Isto corrobora com o quadro de hepatite aguda fulminante, que levou a morte de alguns camundongos, confirmando que animais mais jovens são mais susceptíveis à infecção por MHV (BARTHOLD, SMITH, 2007).

Estes dados demonstram que o modelo de infecção pelo vírus MHV-1, em camundongos BL/6 e *nude*, pode reproduzir principais elementos de patologia pulmonar associada à COVID-19, respectivamente moderada e severa, sem provocar morte precoce destes animais. Assim, esses animais podem ser utilizados para experimentos de coinfeção de coronavírus e outros patógenos respiratórios. Por estas razões, o modelo descrito foi utilizado, para atender o principal objetivo deste trabalho: avaliar impacto da infecção pelo coronavírus na tuberculose experimental, por meio da coinfeção em camundongos.

Como modelo de tuberculose, utilizamos a infecção intratraqueal pela cepa laboratorial Mtb H37Rv, de virulência moderada, que foi previamente estabelecida no nosso laboratório (RIBEIRO *et al.*, 2016, AMARAL *et al.*, 2017, ALMEIDA *et al.*, 2017). A cepa H37Rv induz nos camundongos resistentes BL/6, uma doença de progressão lenta, com a formação de granulomas sólidos no pulmão, após 28 d.p.i. Estes, estão associados ao controle da infecção, sem eliminação completa da microbactéria, sustentando a viabilidade dos camundongos, durante pelo menos um ano. Os experimentos preliminares demonstraram que, a infecção pela cepa H37Rv em camundongos *nude* induz progressão mais rápida da doença, mas sem mortalidade durante pelo menos 45 dias p.i. Dessa forma, a infecção intratraqueal dos animais resistentes ou suscetíveis, pelo Mtb, seguida da infecção intranasal pelo vírus MHV-1, no dia 28 após infecção micobacteriana, permite avaliar o impacto da coinfeção no curso natural das ambas doenças.

Os resultados demonstram que em animais BL/6 coinfectados, a infecção pelo MHV-1 causou no dia 8 p.i, agravamento da histopatologia pulmonar comparado ao grupo infectado somente pelo vírus. Animais coinfectados, exibiram aumento da infiltração difusa pelos leucócitos e aumento de líquido nos alvéolos e bronquíolos. Após 17 dias de coinfeção, foi observada diminuição dos sinais associados à pneumonia viral, como a redução do exsudato líquido nos alvéolos, sugerindo que

animais BL/6 coinfectedos foram capazes de controlar a infecção viral. Esses animais também apresentaram um leve aumento das lesões granulomatosas, causadas pelo Mtb, com desenvolvimento de fibrose em alguns dos granulomas; entretanto, não foi observada alteração do peso dos animais, nem crescimento de microbactérias no pulmão, demonstrando que a severidade da doença não aumentou significativamente. A produção de algumas citocinas, como IL-6, IL-1 β , IL-10 e a produção de NO, foi diminuída nestes animais após 17 dias de coinfecção, comparado ao dia 8. Todavia, a produção da IFN- γ e TNF- α permaneceu em altos níveis. Estes dados sugerem que, os animais resistentes coinfectedos foram capazes de controlar ambas infecções, sem agravamento forte da tuberculose ativa e com sinais de recuperação da pneumonia viral.

Como esperado, animais *nude*, que são atímicos, desenvolveram patologia mais severa, com sinais de infecção crônica. Diferentemente dos animais BL/6, foi observada a permanência da histopatologia de pneumonia viral, com infiltração de células inflamatórias, vasos sanguíneos congestionados e dano alveolar difuso, com fibrina e líquido nos espaços alveolares. Além disso, foi registrado agravamento significativo da patologia tuberculosa com aumento das lesões granulomatosas e desenvolvimento de necrose caseosa nestas áreas, que não foi detectada em outros grupos. Com as análises histopatológicas, observou-se também aumento do número de neutrófilos nas lesões granulomatosas do pulmão, que foi confirmado, de forma quantitativa, pela citometria de fluxo. A população de neutrófilos no pulmão de animais *nude* coinfectedos foi 4 vezes maior, em relação aos animais infectados apenas pelo Mtb, o que pode contribuir para o desenvolvimento da necrose pulmonar nestes animais, devido ao papel patogênico de neutrófilos acumulados no pulmão durante a TB (ALMEIDA *et al.*, 2017). Os resultados de CFU, corroboram com o agravamento da histopatologia, pois revelam aumento significativo, de micobactérias no pulmão entre os dias 36 e 45 p.i, demonstrando que esses animais não contiveram o crescimento do Mtb. O fígado de animais coinfectedos também apresentou agravamento de ambas patogenias, viral e bacteriana, com aumento das áreas infiltradas, áreas com depósito de colágeno e presença de micobactérias que se disseminaram para o fígado. A coinfecção em animais imunodeficientes agravou a morbidade desse grupo, sendo o único que

apresentou redução significativa do peso dos animais, a partir do oitavo dia de coinfeção viral, com uma queda ainda mais expressiva após 17 dias.

Já foi bem demonstrado que a infecção por SARS-CoV-2, pode desenvolver patologia nos rins (LOPES-PACHECO *et al.*, 2021). Somente no grupo de animais *nude* coinfectados, que desenvolveram a doença mais severa, foram observadas algumas alterações similares, das descritas em pacientes de COVID-19, como por exemplo: dilatação e danos nos túbulos proximais e distais, dilatação dos capilares peritubulares e encolhimento de alças capilares nos glomérulos; sugerindo que foram causadas por uma maior disseminação da infecção viral do MHV-1.

Os camundongos *nude* apresentaram níveis muito mais altos de produção de citocinas (com exceção de IFN- γ), comparados aos BL/6. Citocinas e mediadores pró-inflamatórios, IL-6, TNF- α , e NO, aumentaram progressivamente em camundongos *nude* coinfectados e apresentaram maior produção (IL-6 e NO) ou o mesmo nível (TNF- α) comparados aos infectados somente pelo Mtb. Forte produção de IL-1 β foi observada apenas em camundongos infectados pelo Mtb e nos coinfectados, no dia 36 p.i, demonstrando que a produção dessa citocina foi induzida pela microbateria. Interessante, que estes animais atímicos foram capazes de produzir níveis intermediários da IFN- γ , durante todo período do experimento. Esta produção pode ser atribuída às células NK e linfócitos T γ/δ , que são presentes em camundongos *nude* e capazes de produzir IFN- γ (PARDOLL *et al.*, 1988), apesar de ausência de linfócitos T α/β maduros. Os dados obtidos em camundongos *nude* sugerem que, em pacientes suscetíveis, a coinfeção pelo coronavírus e Mtb pode aumentar a possibilidade de desenvolvimento de “tempestade de citocinas” levando ao agravamento de doença.

O perfil celular do pulmão de camundongos *nude* também corresponde a maior severidade da doença nesses animais. A população de células hematopoiéticas CD45+ vivas, acumuladas no pulmão dos animais coinfectados foi menor, em comparação aos animais infectadas apenas pelo vírus. Entretanto, a população das células mortas CD45+ aumentou no grupo de coinfectados, o que foi associado ao desenvolvimento da patologia necrótica no pulmão destes animais. Além disso, a população dos neutrófilos no pulmão aumentou, como mencionado anteriormente. O aumento

expressivo da população de neutrófilos nos grupos de coinfectados, pode estar relacionado a produção de ROS, metaloproteinases, e outros produtos citotóxicos por essas células, levando ao desenvolvimento de áreas de necrose, como foi observado exclusivamente no pulmão dos animais desse grupo.

Os resultados obtidos permitem concluir que, nos animais resistentes (BL/6), a coinfeção pelo coronavírus não alterou significativamente o curso da TB ativa; na qual os animais foram capazes de controlar a infecção micobacteriana. Entretanto, no hospedeiro imunodeficiente (Balb/c *nude*), ambos patógenos foram capazes de induzir infecção crônica progressiva, com aumento da severidade da doença pulmonar e significativo agravamento da histopatologia tuberculosa no pulmão, o que resultou no desenvolvimento da necrose intragranulomatosa.

Até onde sabemos, esses são os primeiros dados que demonstram diretamente, como uma infecção por coronavírus pode afetar o curso natural da tuberculose, em um hospedeiro imunocompetente ou imunodeficiente. Os dados obtidos sugerem que nos pacientes imunodeficientes com TB, a coinfeção pelo SARS-CoV-2 pode agravar curso natural das ambas as doenças, levando ao agravamento rápido da patologia pulmonar e promovendo disseminação dos patógenos aos outros órgãos.

7. Conclusões

- A infecção viral de camundongos C57BL/6 pelo MHV-1 foi capaz de causar pneumonia intersticial viral e disseminação do vírus para o fígado, similar à COVID-19 moderada em humanos;
- A infecção com vírus MHV-1 em camundongos *nude*, atímicos, induziu a histopatologia, similar à Síndrome respiratória aguda grave (SARS), observada em pacientes com COVID-19 grave;
- Camundongos *nude* mais jovens, de 4 semanas de idade (ainda lactentes), apresentam maior susceptibilidade à infecção viral, em

comparação aos animais adultos, que causou grave patologia no fígado e levou à morte, após infecção pelo vírus MHV-1;

- Em camundongos BL/6, a coinfeção pelo coronavírus MHV-1 não alterou significativamente o curso da TB ativa; na qual os animais foram capazes de continuar o controle da infecção micobacteriana, com progressão lenta da patologia da TB e recuperação da infecção viral;
- A coinfeção Mtb e MHV-1, em animais imunodeficientes (*nude*) causou agravamento da TB, com progressão rápida da patologia pulmonar, necrose intragranulomatosa, permanência de pneumonia viral e aumento das lesões patológicas no fígado e rins;
- Foi desenvolvido um modelo experimental da comorbidade COVID/TB em camundongos que permite investigar os impactos da infecção pelo coronavírus patogênico no curso da tuberculose pulmonar.

8. Referências

ALFARAJ, S. H. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus and Pulmonary Tuberculosis Coinfection: Implications for Infection Control. **Intervirolgy**, v. 60, n. 1–2, p. 53–55, 2017.

ALMEIDA, Fabrício M. et al. Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. **Plos One**, v. 12, n. 3, p.1-19, mar. 2017a.

AMARAL, E. P., Ribeiro, S. C., Lanes, V. R., Almeida, F. M., de Andrade, M. R., Bomfim, C. C., Salles, E. M., Bortoluci, K. R., Coutinho-Silva, R., Hirata, M. H., Alvarez, J. M., Lasunskiaia, E. B. e D'Imperio-Lima, M. R. Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS Pathog**, v.10, n.7, Jul, p.e1004188. 2014.

ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira et al. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **Journal of Virology**, v. 95, n. 22, p. e01276-21, 2021.

AZKUR, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020.

BARTHOLD, Stephen W.; SMITH, Abigail L. Mouse hepatitis virus. In: **The mouse in biomedical research**. Academic Press, 2007. p. 141-178.

BERMEJO-MARTIN, J. F. et al. Lymphopenic community acquired pneumonia as signature of severe COVID-19 infection. **Jesús F Bermejo-Martin**, v. 80, n. January, p.

BRIZIĆ, I. et al. Cytomegalovirus Infection: Mouse Model. **Curr Protoc Immunol.**, p. 1–23, 2020.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. L. Heterogeneity in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 691–702, 2017.

CANADAY, D. H. et al. CD4 + and CD8 + T Cells Kill Intracellular Mycobacterium tuberculosis by a Perforin and Fas/Fas Ligand-Independent Mechanism . **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2734–2742, 2001.

CERVANTES-BARRAGAN, L. et al. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell- derived type I interferon. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1131– 1137, 2007.

CHANNAPPANAVAR, R. et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 2, p. 181–193, 2016.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 393–422, 2009.

Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, 2014.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

DE ALBUQUERQUE, N. et al. Murine Hepatitis Virus Strain 1 Produces a Clinically Relevant Model of Severe Acute Respiratory Syndrome in A/J Mice. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10382–10394, 2006.

FAN, Xiaoyi et al. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

FERRAZ, J. C. et al. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1387–1397, 2006.

FINE, P. E. M. et al. **Issues relating to the use of BCG in immunization programmes - A discussion document** Geneva World Health Organization, , 1999.

GALLAGHER, Thomas M.; BUCHMEIER, Michael J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 371-374, 2001.

GOLDEN, Joseph W. et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. **JCI insight**, v. 5, n. 19, 2020.

HADJADJ, J. et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 724, n. August, p. 718–724, 2020.

HOMBERGER, F. R.; ZHANG, L.; BARTHOLD, S. W. Prevalence of Enterotropic and Polytopic Mouse Hepatitis Virus in Enzootically Infected Mouse Colonies. **Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 50–54, 1998.

HUNTER, R. L. et al. Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 36, n. 4, p. 371–386, 2006.

ICTV, **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em <<https://ictv.global/taxonomy>>.

Immunopathology of tuberculosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 103–111, 2007.

ITIS, **Integrated Taxonomic Information System – Report**. Disponível em <<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>>.

JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

KAUFMANN, S. H.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P. H. New vaccines for tuberculosis.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 2, p. 131–137, 2006.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79–83, 2008.

KHANOLKAR, A. et al. Protective and Pathologic Roles of the Immune Response to Mouse Hepatitis Virus Type 1: Implications for Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Virology**, v. 83, n. 18, p. 9258–9272, 2009.

KHANOLKAR, A. et al. T cell Epitope Specificity and Pathogenesis of MHV-1 Induced Disease in Susceptible and Resistant Hosts¹. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1132–1141, 2010.

KLAUSEGGER, A. et al. Identification of a Coronavirus Hemagglutinin-Esterase with a Substrate Specificity Different from Those of Influenza C Virus and Bovine Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3737–3743, 1999.

KÖRNER, Robert W. et al. Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 880, 2020.

LASUNSKAIA, E. B. et al. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1480–1490, 2006.

LEE, S. J.; CHANNAPPANAVAR, R.; KANNEGANTI, T. D. Coronaviruses: Innate

Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1083–1099, 2020.

LEI, X. et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

LEIBOWITZ, J.; KAUFMAN, G.; LIU, P. **Coronaviruses: Propagation, quantification, storage, and construction of recombinant mouse hepatitis virus**. [s.l: s.n.].

LEVY, G. A., LEIBOWITZ, J. L. & EDINGTON, T. S. (1981). Induction of monocyte procoagulant activity by routine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice. *Journal of Experimental Medicine* 154, 1150-1163.

LOPES-PACHECO, Miqueias et al. Pathogenesis of multiple organ injury in COVID-19 and potential therapeutic strategies. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 593223, 2021.

LOW, J. G. et al. Severe acute respiratory syndrome and pulmonary tuberculosis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 12, p. 123–125, 2004.

MENTER, Thomas et al. Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. **Histopathology**, v. 77, n. 2, p. 198-209, 2020.

MIRZAEI, R. et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2097–2111, 2020.

NUNN, P. et al. Tuberculosis control in the era of HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 819–826, 2005.

ORME, Ian M.; COLLINS, Frank M. Mouse model of tuberculosis. **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**, p. 111-134, 1994.

OTTENHOFF, T. H. M.; KAUFMANN, S. H. E. Vaccines against tuberculosis: Where are we and where do we need to go? **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, 2012.

PAIDAS, Michael J. et al. Long-Term Sequelae of COVID-19 in Experimental Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 10, p. 5970-5986, 2022.

PAIDAS, Michael J. et al. Multi-Organ Histopathological Changes in a Mouse Hepatitis Virus Model of COVID-19. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1703, 2021.

PARDOLL, D. M. et al. Thymus-dependent and thymus-independent developmental pathways for peripheral T cell receptor-gamma delta-bearing lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 12, p. 4091-4096, 1988.

PATHAK, L. et al. Corona virus activates a stem cell mediated defense mechanism that accelerates activation of dormant tuberculosis: implications for the COVID-19 pandemic. **Health Evaluation and Promotion**, v. 47, n. 1, p. 248–250, 2020.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, p. 353–384, 2012.

RIBEIRO, S. C. M. et al. Mycobacterium tuberculosis Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely To Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v.52, n. 7, p.2615-2624, maio 2014.

ROBBA, Chiara et al. Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. **Expert review of respiratory medicine**, v. 14, n. 9, p. 865-868, 2020.

RYDELL-TÖRMÄNEN, Kristina; JOHNSON, Jill R. The applicability of mouse models to the study of human disease. In: **Mouse Cell Culture**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 3-22.

SACCHETTINI, J. C.; RUBIN, E. J.; FREUNDLICH, J. S. Drugs versus bugs: In pursuit of the persistent predator Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 41–52, 2008.

SATARKER, S.; NAMPOOTHIRI, M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. **Archives of Medical Research**, v. 51, n. 6, p. 482–491, 2020.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. Life and death in the granuloma:

SHI, C. S. et al. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. **Cell Death Discovery**, v. 5, n. 1, 2019.

SNIJDER, E. J. et al. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. **Journal of Molecular Biology**, v. 331, n. 5, p. 991–1004, 2003.

SU, D. H. W.; CHEE, S. P. Maculopathy in dengue fever [8]. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 707, 2006.

The Lancet, v. 375, n. 9731, p. 2110–2119, 2010.

TORRADO, E.; ROBINSON, R. T.; COOPER, A. M. Cellular response to mycobacteria: Balancing protection and pathology. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 2, p. 66–72, 2011.

TRANTAFILOU, K.; TRIANTAFILOU, M. Ion flux in the lung: Virus-induced inflammasome activation. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 580–588, 2014.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 531, n. 2, p. 241–247, 2002.

VIRELIZIER, J.-L.; ALLISON, A. C. Correlation of persistent mouse hepatitis virus (MHV-3) infection with its effect on mouse macrophage cultures. **Archives of Virology**, v. 50, n. 4, p. 279-285, 1976.

W. BARTHOLD, S.; L. SMITH, A. **Mouse Hepatitis Virus**. [s.l: s.n.].

WANG, C. et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the

pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 57, p. 102833, 2020a.

WANG, Q. et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894- 904.e9, 2020b.

WHO. **Global Tuberculosis Report**World Health Organization. [s.l: s.n.].

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

YE, Z. W. et al. Zoonotic origins of human coronaviruses. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1686–1697, 2020.

ZALINGER, Z. B.; ELLIOTT, R.; WEISS, S. R. Role of the inflammasome-related cytokines Il-1 and Il-18 during infection with murine coronavirus. **Journal of NeuroVirology**, v. 23, n. 6, p. 845–854, 2017.

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

ZHAO, Wenbin et al. The mechanism of multiple organ dysfunction syndrome in patients with COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 1886-1892, 2022.

ZHENG, M. et al. Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 41, p. 14040–14052, 2020

9. Anexos



Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

REITORIA

Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 482, intitulado "ESTUDO DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, SUA COINFEÇÃO COM OUTROS PATÓGENOS EMERGENTES, E NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO ADJUVANTE DA TUBERCULOSE PULMONAR NO MODELO MURINO" sob a responsabilidade da Dr.^a Elena Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 25/05/2021 como um aditivo ao protocolo nº 350. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 25/05/2025.

Campos dos Goytacazes, 25 de maio de 2025.

Clóvis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais



Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) - 2739-7180 correio eletrônico: adrianafaria@uenf.br