UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Larissa Mendes Barbosa Lucas

A INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR MHV-A59 NA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E SEU IMPACTO NA INFECÇÃO MURINA POR *Candida albicans*

Belo Horizonte

2025

Larissa Mendes Barbosa Lucas

A INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO POR MHV-A59 NA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E SEU IMPACTO NA INFECÇÃO MURINA POR *Candida albicans*

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profª. Drª. Daniele da Glória de Souza

Coorientadora: Drª. Raquel Duque do Nascimento Arifa

Belo Horizonte

2025

043 Lucas, Larissa Mendes Barbosa.
A influência da infecção por MHV-a59 na resposta imune adaptativa e seu impacto na infecção murina por Candida albicans [manuscrito] / Larissa Mendes Barbosa Lucas. – 2025.
78 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profª. Drª. Daniele da Glória de Souza. Coorientadora: Drª. Raquel Duque do Nascimento Arifa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Covid-19. 3. Inflamação. 4. Linfócitos. 5. Candida albicans. I. Souza, Daniele da Glória de. II. Arifa, Raquel Duque do Nascimento. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **LARISSA MENDES BARBOSA LUCAS**

Nº REGISTRO: 2023665790

À s 14:00 horas do dia **31 de janeiro de 2025**, reuniu-se, presencialmente no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Cristiana Couto Garcia (Fundação Oswaldo Cruz - Instituto René Rachou (MG), Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza (Orientadora) e a Dra. Raquel Duque do Nascimento Arifa, para julgar o trabalho final **"A influência da infecção por MHV-A59 na resposta imune adaptativa e seu impacto na infecção murina por Candida albicans",** da aluna **Larissa Mendes Barbosa Lucas**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2025.

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Dra. Cristiana Couto Garcia

De acordo:

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Orientadora)

Dra. Raquel Duque do Nascimento Arifa

(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de assis Santos

(Coordenador do Programa de Pós-graduação

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Raquel Duque do Nascimento Arifa**, **Usuário Externo**, em 03/02/2025, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Couto Garcia**, **Usuária Externa**, em 03/02/2025, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 03/02/2025, às 10:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza**, **Professora do Magistério Superior**, em 03/02/2025, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Flavio Guimaraes da Fonseca**, **Professor do Magistério Superior**, em 03/02/2025, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mila Fernandes Moreira Madeira**, **Professora do Magistério Superior**, em 04/02/2025, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Xavier Lima**, **Chefe de departamento**, em 04/02/2025, às 13:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3882775** e o código CRC **98C144AF**.

Referência: Processo nº 23072.209670/2023-46 SEI nº 3882775

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Daniele da Glória e coorientadora Dra. Raquel Arifa, pela experiência de ensinamento, inspiração, suporte e auxilio na transformação da pesquisadora que hoje eu sou. Aqui, acrescento também os meus colaboradores internos e externos ao laboratório, bem como as agências de fomento, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à pessoa mais importante da minha vida, meu filho Lucca, que me mostrou que a maternidade jamais seria um empecilho para realização do meu sonho, sendo sempre minha maior motivação e lugar seguro para me encher de vida e felicidade em todos os momentos.

Ao meu marido Luiz Renato eu agradeço por tanto e por tudo, é de longe a pessoa que mais entende o impacto do processo e dessa realização, apesar de todas as dificuldades e minha ausência frequente, nunca saiu do meu lado e nem me deixou desistir.

Meus queridos pais José Mendes e Karla, não foram coadjuvantes e sim protagonistas nessa trajetória, incentivando financeiramente e emocionalmente em cada passo, sempre vibrando com minhas conquistas e confiando que o futuro me reserva grandes realizações.

Agradeço também a minha sogra Mércia, pelo acolhimento afetivo, e em seu lar, e por todo suporte desde sempre.

Aos meus grandes amigos de toda uma vida, que hoje considero irmãos, Douglas e Durval, por sempre estarem aqui independente da distância ou circunstância.

Agradeço com muito carinho aos colegas que a UFMG me trouxe, Anna Paula e Igor pela troca científica e de vida nos corredores do ICB.

Agradeço a toda equipe de alunos e professores do Laboratório de Interação Micorganismo-Hospedeiro (LIMHO), especialmente: Samantha, Bárbara, Cínthia, Renan, Adriane, Victor G., Anna Clara, Rafael e Maria Eduarda, meus amigos que sem dúvida, tornaram meus dias infinitamente melhores.

Por fim, agradeço a todos os professores pela troca de experiência em sala de aula, seminários e palestras. Em especial, o professor Rodrigo Rodrigues pela experiência proporcionada através do treinamento didático.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2 que provocou uma pandemia, levando à um alto número de mortes e comorbidades. A vacinação contra SARS-COV-2 contribuiu para uma regressão no número de mortes, no entanto, foi constatado que, mesmo com a vacinação, pacientes acometidos pela COVID-19 podem apresentar persistência de sintomas após a recuperação da doença, ou mesmo surgimento de novos sintomas. Essa sintomatologia tardia é caracterizada como COVID longa, entretanto, os mecanismos imunes responsáveis pela COVID longa ainda não são bem esclarecidos. Com o intuito de avaliar a suscetibilidade a agravamento em infecção posterior, em contexto de COVID longa, optamos por utilizar a *Candida albicans* em nossas avaliações. A *C. albicans* é um fungo de extrema importância clínica, com alta incidência em contextos infecciosos oportunistas, inclusive em infecções por SARS-CoV-2. Assim, nosso objetivo foi investigar se as alterações no perfil de ativação de linfócitos T induzidas pela infecção por coronavírus murino interfere na susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Candida albicans*. Para isso, empregamos modelo *in vivo* de infecção, utilizando camundongos C57BL/6 fêmeas infectados com MHV-A59 por via intranasal, explorando inicialmente dois tempos de infecção. No primeiro experimento, foi realizada a infecção com MHV-A59 e após sete dias a infecção com *C. albicans*, e os animais eutanasiados após dois dias de infecção com *C. albicans*. Em outro experimento, considerando um tempo mais tardio de infecção, os animais foram previamente infectados com MHV-A59 e após vinte e um dias infectados com *C. albicans*, sendo a eutanásia após dois dias de infecção com *C. albicans*. Foi coletado o lavado bronco-alveolar para análise de recuperação fúngica e avaliação do perfil de células T através de citometria de fluxo. O pulmão foi coletado para análises histopatológicas, de recuperação fúngica e viral, avaliação no perfil de ativação de células T, avaliação da atividade de neutrófilos e quantificação de citocinas. Em adição, também avaliamos a função pulmonar dos animais em tempos tardios, através de espirometria. Em nossas análises histopatológicas demonstramos que a infecção com *Candida albicans* após sete dias de infecção com MHV-A59 induziu um aumento de infiltrado inflamatório. Entretanto, quando os animais foram infectados com *Candida albicans* vinte e um dias após a infecção com MHV-A59, eles apresentaram perda significativa da estrutura do tecido pulmonar. Nossos resultados demonstraram que a infecção somente com *C. albicans* ou MHV-A59 não foi capaz de induzir aumento de linfócitos, por outro lado, o grupo submetido a ambas infecções apresentou aumento de células TCD8. No entanto, grupos infectados apenas com *C. albicans*, apresentaram aumento

em células T reguladoras em relação aos grupos previamente infectados com MHV-A59 e posteriormente infectados com *C. albicans*. Esses resultados sugerem a ineficiência do hospedeiro em desenvolver uma resposta reguladora frente a uma segunda infecção. De maneira interessante, nós observamos que apesar das alterações no perfil de celular, a infecção com MHV não interferiu no *clearance* de *C. albicans,* bem como não induz alterações na atividade de neutrófilos. Também avaliamos função pulmonar em animais infectados com *C. albicans* vinte um dias após a infecção por MHV-A59, e eutanasiados após dois e nove dias de infecção por *C. albicans*. Nossos resultados demonstraram comprometimento da função pulmonar após nove dias de infecção por *C. albicans*, com alterações dos parâmetros relacionados ao aumento do fluxo de ar e distensão do pulmão, compatível com o observado em doença pulmonar obstrutiva. Em conclusão, esses resultados indicam que a infecção por MHV-A59 induziu aumento de células T efetoras sem regulação adequada por células T reguladoras, frente a infecção secundária por *C. albicans*, provocando lesão pulmonar e comprometimento da função pulmonar.

Palavras-chave: COVID longa; COVID-19; inflamação; linfócitos; *Candida albicans*.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus that has led to a pandemic and has resulted in a high number of deaths and comorbidities. Vaccination against SARS-CoV-2 has contributed to reduce the number of deaths. However, it has been observed that patients infected with COVID-19 may have persistent symptoms despite vaccination or may develop new symptoms after recovery from the disease. This late-onset symptomatology is referred to as long COVID, although the immune mechanisms responsible for long COVID are not yet fully understood. In order to assess susceptibility to worsening in a subsequent infection, in the context of long COVID, we chose to use *Candida albicans* in our evaluations. *C. albicans* is a fungus of great clinical importance, with a high incidence in opportunistic infectious contexts, including infections caused by SARS-CoV-2. Our aim was therefore to investigate whether changes in the activation profile of T lymphocytes induced by coronavirus infection in mice influence host susceptibility to *Candida albicans* infection. To this end, we used an in vivo infection model in which we infected female C57BL/6 mice with MHV-A59 by intranasal administration and initially examined two infection time points. In the first experiment, the mice were infected with MHV-A59 and infected with C. albicans after seven days and euthanized two days after *C. albicans* infection. In another experiment with a later infection time point, the animals were pre-infected with MHV-A59 and infected with *C. albicans* after twenty-one days and euthanized two days after *C. albicans* infection. Bronchoalveolar lavage was collected for analysis of fungal utilization and evaluation of the T-cell profile by flow cytometry. Lungs were harvested for histopathologic analysis, analysis of fungal and viral debris, assessment of T-cell activation profile, assessment of neutrophil activity, and quantification of cytokines. We also examined the lung function of the animals at later time points using spirometry. In our histopathologic analyzes, we demonstrated that *C. albicans* infection led to an increase in inflammatory infiltrates seven days after MHV-A59 infection. However, when the animals were infected with *C. albicans* twenty-one days after MHV-A59 infection, they showed a significant loss of lung tissue structure. Our results showed that infection with *C. albicans* or MHV-A59 alone was not sufficient to cause an increase in lymphocytes. However, the group exposed to both infections showed an increase in CD8+ T cells. Nevertheless, the groups infected only with *C. albicans* showed an increase in regulatory T cells compared to the groups infected first with MHV-A59 and then with *C. albicans*. These results suggest that the inability of the host to develop a regulatory response against secondary infection is a key factor. Interestingly, we observed that MHV-A59

infection did not affect the clearance of *C. albicans* or induce changes in neutrophil activity, despite the changes in cellular profile. We also examined the lung function of animals infected with *C. albicans* twenty-one days after MHV-A59 infection and euthanized two and nine days after *C. albicans* infection. Our results showed pulmonary dysfunction after nine days of *C. albicans* infection, with changes in parameters related to increased airflow and pulmonary hyperinflation consistent with findings in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). In summary, these results suggest that MHV A59 infection in response to secondary *C. albicans* infection triggers an increase in effector T cells without adequate regulation by regulatory T cells, leading to lung damage and impaired lung function.

Keywords: Long COVID; COVID-19; inflammation; lymphocytes; *Candida albicans*.

LISTA DE ABREVIAÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACE2: Enzima conversora de angiotensina 2

ATCC: American Type Culture Collection

BAL: Lavado broncoalveolar

BSA: Albumina séria bovina

CCHORD: Complacência estática

CDYN: Complacência dinâmica

CFU: Unidade formadora de colônia

CL: COVID Longa

CP0: Complacência no primeiro milissegundo

CPK: Pico de complacência

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DPI: Dias pós infecção

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

FEV: Volume expiratório forçado

FVC: Capacidade vital forçada

H&E: Coloração hematoxilina-eosina

IC: Capacidade inspiratória

IFN: Interferon

IL: Interleucina

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MHV: Murine hepatatite virus

MHV: Murine hepatite virus

MPO: Mieloperoxidase

NB: Nível de Biossegurança

NK: *Natural Killer*

OD: Densidade optica

PAMPS: Padrões Moleculares associados a patógenos

PBS: hosphate-buffered saline – salina tamponada por fosfato

PFU: Unidade formadora de placa

RL: Resistência pulmonar

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SARS: Sindrome Respiratória Aguda Grave

TFP: T foliculares helper

TGF: Fator de crescimento transformador

TH: Células T auxiliares

Treg: Célula T reguladora

TV: Volume corrente de ar

UTI: Unidade de tratamento intensivo

VOC: Variante de preocupação

VOI: Variante de interesse

RBD: *Receptor Binding Domain*

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

RLR: Receptores semelhantes a RIG-I

TLR: Receptor *Toll-Like*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura viral de SARS-CoV-2. 19

Figura 2. Ciclo de replicação SARS-CoV-2. 21

Figura 3. Resposta imunológica do hospedeiro durante infecção por SARS-CoV-2. 24

Figura 4. Delineamento experimental dos tempos de infecções. 37

Figura 5. Delineamento experimental de cinética em função pulmonar. 39

Figura 6. Estratégia de gates consideradas em avaliação de citometria de fluxo. 41

Figura 7. Imagens representativas de alterações histopatológicas de pulmão com escore inflamatório, após 9 dias de infecção por MHV-A59, 2 dpi de *C. albicans* ou ambas as infecções. 46

Figura 8. Imagens representativas de alterações histopatológicas de pulmão com escore inflamatório, após 23 dias de MHV-A59, 2 dpi de *C. albicans* ou ambas as infecções. 47

Figura 9. Caracterização de linfócitos em amostras de pulmão e BAL em delineamento experimental de 9 dpi de MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. 48

Figura 10. Caracterização de linfócitos em amostra de pulmão e lavado bronco-alveolar em delineamento experimental de 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. 50

Figura 11. Quantificação de *C. albicans* utilizando 9 e 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*. 52

Figura 12. Avaliação da enzima mieloperoxidase em pulmão. 53

Figura 13. Quantificação de quimiocinas no pulmão de animais infectados com MHV-A59 e *C. albicans*. 55

Figura 14. Avaliação da função pulmonar em 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*. . 56

Figura 15. Avaliação da função pulmonar em 30 dpi de MHV-A59 e 9 dpi de *C. albicans*. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos dados de avaliação de linfócitos através de citometria de fluxo.....51

Tabela 2. Resumo dos dados de avaliação de função pulmonar.....59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 COVID-19 16
1.1.1 Epidemiologia 16
1.1.2 SARS-CoV-2 18
1.1.3 Patogênese 21
1.1.4 Sintomatologia 26
1.2 Desenvolvimento da COVID longa e sua influência na resposta imunológica 27
1.3 Modelo de infecção murino de coronavirose 30
1.4 *Candida albicans* como infecção oportunista 31

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE 34

3. OBJETIVOS 35

3.1 Objetivo geral 35
3.2 Objetivos específicos 35

4. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA 36

4.1 Animais e microrganismos 36
4.2 Infecção e pós-infecção 37
4.3 Avaliação de carga viral 39
4.4 Análise histológica de pulmão 39
4.5 Citometria de fluxo 40
4.6 Quantificação de *C. albicans* por plaqueamento 42
4.8 Quantificação de quimiocinas por ELISA 43
4.9 Avaliação de função pulmonar por espirometria 43
4.10 Análises estatísticas 44

5. RESULTADOS 45

5.1 Sete ou vinte e um dias após a infecção intranasal com MHV-A59 não há mais recuperação de vírus viável no baço, fígado ou pulmão 45
5.2 A infecção prévia pelo MHV-A59 exacerba a lesão pulmonar induzida por *C. albicans* 45

5.3 A infecção prévia por MHV-A59 induz alterações na resposta imune adaptativa frente a infecção por *C. albicans*, caracterizado por um aumento nas células TCD8 e diminuição de T reguladoras 48
5.4 Alterações no perfil de ativação de linfócitos TCD8 em resposta às células T reguladoras durante infecção tardia por MHV-A59 e posterior infecção por *C. albicans* 49
5.5 A infecção prévia por MHV-A59 não altera o *clearance* de *C. albicans* 52
5.6 A infecção por *C. albicans* induz aumento na atividade de neutrófilos 53
5.7 A infecção por MHV-A59 induz alterações na função pulmonar, que persistem após a infecção por *C. albicans,* em tempos mais longos de infecção 55
6. DISCUSSÃO 60
7. CONCLUSÃO 67
8. REFERÊNCIAS 68

1. INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

1.1.1 Epidemiologia

A COVID-19 foi declarada como pandemia em março de 2020, com os primeiros casos identificados na China em dezembro de 2019 e com rápida disseminação para outros países. Essa doença levou a comorbidades de vários indivíduos, bem como o uma alta taxa de mortalidade, gerando um grande impacto nos sistemas de saúde a nível global (Pascoal, D. *et al.* 2020). Após sequenciamento genético, pôde-se identificar a semelhança entre esse vírus e outros vírus da família coronavírus que causavam o desenvolvimento da Síndrome Respiratória Aguda, sendo então identificado como SARS-CoV-2, um vírus que se dissemina através das vias aéreas e que possui uma alta capacidade de transmissão (Adriano, M. *et al*. 2020).

A interação entre humanos e coronavírus não é recente, já foi demonstrado que outros vírus pertencentes à mesma família do SARS-CoV-2 tem potencial de causar doença em humanos, como o SARS e o MERS-CoV. O SARS causou uma epidemia entre 2002 e 2003 na China, em pacientes imunossuprimidos, e se disseminou pela América do Sul, América do Norte, Europa e Ásia, chegando a um número acima de 8 mil infectados com alta taxa de mortalidade (Le Bert, N. *et al*. 2020; Pascoal, D. *et al.* 2020). Já a infecção pelo MERS-CoV, que é altamente patogênico, foi descrita em países do Oriente Médio nos anos de 2012 e 2013, se espalhando para vários países, principalmente por meio de turistas que viajaram dos Emirados Árabes e Arábia Saudita para os Estados Unidos (Bialek, S. *et al*. 2014). Outras espécies de coronavírus também foram identificadas como patógenos que infectam outras espécies de animais, incluindo mamíferos e aves, como exemplo temos o *Murine hepatite vírus* (MHV), reconhecido como um patógeno natural de ratos e camundongos (Koerner, R. *et al*. 2020).

O termo COVID-19 utilizado para doença induzida pela infecção por SARS-CoV-2 foi empregado devido ao ano onde se iniciaram as primeiras infecções, sendo este 2019. Todavia, após 3 anos depois, em maio de 2023, foi declarado fim da emergência de saúde pública para COVID-19. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), até o presente momento, o número de casos confirmados já ultrapassou 775 milhões e o número de mortes associadas ao COVID-19 já chegou a marca de 7 milhões (World Health Organization. 2025,

01 de janeiro). A redução no número de óbitos somente se tornou evidente após o início do processo de vacinação da população em escala global, e esse processo requer constante atualização devido a capacidade de mutação do vírus, que pode comprometer a eficácia imunológica da vacina (Filho, A., *et al.* 2022).

A infecção por SARS-CoV-2 ainda permanece sendo um motivo de preocupação, visto que existem muitas lacunas a serem elucidadas quanto à patogênese da doença. De acordo com dados epidemiológicos recentemente disponibilizados pela OMS, as infecções permanecem em níveis elevados, com uma média de aproximadamente 16 mil novos casos registrados semanalmente (World Health Organization, 2024, 6 de novembro). Além disso, como mostram os registros epidemiológicos, uma alta parcela da população foi infectada e não conhecemos as consequências dessa infecção a longo prazo (Filho, A., *et al.* 2022).

Diversas variantes surgiram ao longo do tempo, e a partir disso, a OMS determinou uma classificação de acordo com a transmissibilidade ou alteração na apresentação da doença, onde separa em dois grupos sendo VOIs (variantes de interesse) que inclui o grupo de variantes que possuem mutações que podem ser relevantes no contexto de transmissibilidade e gravidade, e as VOCs (variantes de preocupação), onde existe evidências claras de maior transmissibilidade e gravidade da doença, impactos na saúde púlbica ou alterações na efetividade das vacinas. Baseado nessa classificação, cinco variantes foram identificadas como VOCs, nesse grupo pode-se incluir as variantes Alpha, Delta, Beta, Gamma e Omicron (Hillary, V., Ceasar, S. 2023).

Atualmente, a variante que circula resulta em sintomas mais brandos do que a cepa original, todavia, possui uma taxa de infecção e multiplicação viral cerca de 70 vezes maior, e foi denominada como Ômicron. Essa variante foi identificada inicialmente na região da África no fim do ano de 2021, e se distribuindo rapidamente em diversos outros países. A variante Ômicron é classificada como uma VOC, sua alta transmissibilidade está associada a um número significativo de mutações localizadas principalmente na região RBD da proteína S. Essas alterações estruturais contribuem para o aumento da capacidade de infecção viral, resultando em uma elevação expressiva no número de casos por todo o mundo (Hillary, V., Ceasar, S. 2023; Firouzabadi, N., *et al*. 2023). Sabendo-se que a variante circulante atualmente se trata da Ômicron, as vacinas bivalentes têm sido uma boa alternativa, pois fornecem proteção contra a cepa original e sublinhagens da variante Ômicron, com um alto

potencial de ação na redução de novas infecções e especialmente, na redução da gravidade da doença (Di Fusco, M., *et al*. 2023).

1.1.2 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae* e à ordem Nidovirales, espécie *Betacoronavirus pandemicum*. Por meio de análises filogenéticas, evidências apontam que o SARS-CoV-2 se originou como um vírus zoonótico, devido a alta semelhança genética com outros vírus da mesma família já identificados em espécies de morcegos, que atuam como reservatório natural, sugerindo então o transbordamento desse vírus a partir do morcego, com algumas modificações, até os humanos (Rehman, S. et al.2020).

O SARS-CoV-2 trata-se de um vírus com material genético de tamanho aproximado de 29 Kb de comprimento, que se apresenta em RNA de fita simples de sentido positivo, possui núcleo capsídeo, é envelopado e em sua membrana possui a proteína M (glicoproteína de membrana), proteína S (glicoproteína Spike) e a proteína E (proteína do envelope viral). A figura 1 ilustra a partícula do vírus SARS-CoV-2 destacando suas estruturas principais. A proteína S possui duas subunidades (S1 e S2) relacionadas à fusão da partícula viral à célula hospedeira. A proteína M é amplamente distribuída ao longo da partícula viral, enquanto a proteína E participa no processo de lise da partícula viral no interior da célula hospedeira bem como é responsável pela montagem da partícula. Dentro da partícula viral é encontrada apenas uma proteína estrutural que é denominada como proteína N (nucleocapsídeo), responsável por proteger e estabilizar o genoma viral (Cui, J. *et al*. 2019; Pekar, J. *et al*. 2022; Jackson, C. et al. 2022; Yang, H.; Rao, Z. 2021).

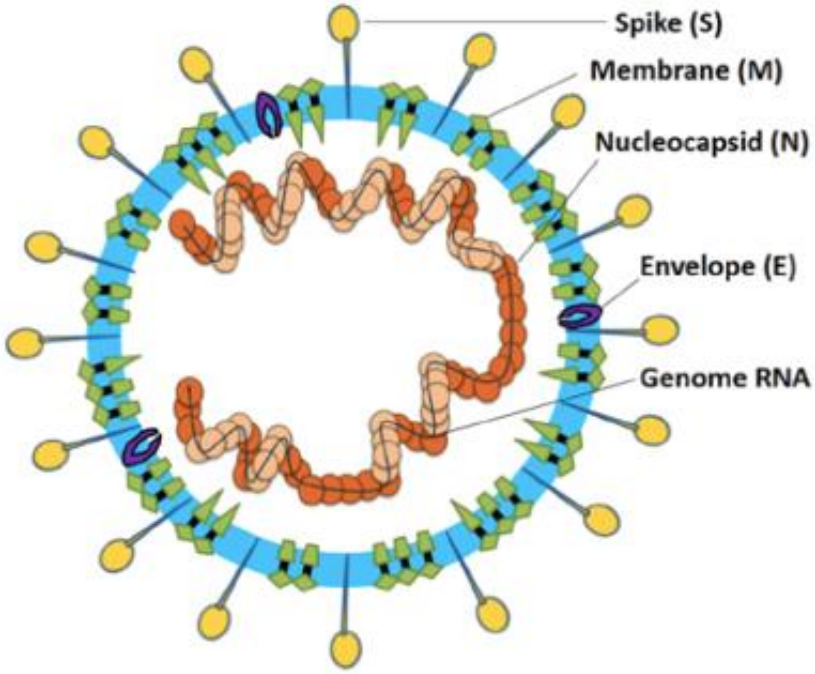

Figura 1: Representação da estrutura viral de SARS-CoV-2. Em amarelo, destacam-se as estruturas denominadas como proteína S, que atua auxiliando a entrada do vírus na célula hospedeira ao ser reconhecida pelo receptor ACE2. A proteína do E compreende a estrutura demonstrada na cor roxa, identificada como domínio transmembranar que possui domínio C-terminal e N-terminal. As estruturas representadas na cor verde são denominadas como proteína M que se encontram na membrana da partícula viral. A proteína N simbolizada pela cor laranja é encontrada dentro da partícula viral envolvendo todo o genoma do vírus, que se apresenta com RNA de fita simples (Fonte: Li, G. *et al.* 2020).

A principal rota de infecção do SARS-CoV-2 ocorre através de inalação de gotículas e aerossóis dispersos no ambiente, frequentemente capturadas pelas mucosas nasais. O SARS-CoV-2 inicia sua infecção, preferencialmente, em células epiteliais das vias aéreas. Subsequentemente, o vírus é capaz de infectar outras células epiteliais, alveolares, endoteliais e macrófagos alveolares, devido a presença do receptor ACE2 nessas células, que serve como receptor para a entrada viral (Sanz, J., *et al*. 2021).

O ciclo de multiplicação desse vírus se inicia com a adesão às células epiteliais e posteriormente a ligação do vírus através da proteína S ao receptor ACE2. Após essa ligação ocorre a clivagem da proteína S através da protease celular Transmembranar Serina 2 (TMPRRS2), o que leva a mudança conformacional da proteína S, resultando em duas subunidades que possuem funções distintas no processo de endocitose viral. A subunidade S1 da proteína S contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) e promove a ligação do vírus à

célula alvo. A Subunidade S1 possui 2 extremidades N-terminal e C-terminal, a extremidade N-terminal reconhece um receptor ACE2 presente na superfície da célula hospedeira, enquanto a extremidade C-terminal desempenha um papel crucial na fusão entre o vírus e a membrana celular. A subunidade S2 assume a função de mediar a fusão entre o vírion e a membrana celular no processo de exocitose viral (Lima, L., *et al*. 2020; Fiuza, L. *et al*. 2020).

A entrada do vírus à célula ocorre através de endocitose dependente de clatrina, e após a internalização do vírus na célula, ocorre a acidificação do endossomo, com a redução do pH intraluminal, sendo que o pH ácido induz mudanças conformacionais de proteínas estruturais, facilitando a liberação subsequente do material genético viral (Kreutzberger, A. *et al*. 2022). Após a liberação do material genético viral (RNA) no citoplasma celular, que por ser um RNA de sentido positivo, pode ser prontamente traduzido em poliproteínas nos ribossomos da célula hospedeira, que, posteriormente, darão origem a glicoproteínas funcionais chamadas de pp1a e pp1b, que resultam em 16 proteínas não-estruturais responsáveis pela replicação e transcrição do vírus, enquanto outros locais do gene codificam proteínas estruturais (M, E, S e N). Como demonstrado na figura 2, partículas de vírons serão formadas entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi e liberadas por exocitose para o ambiente extracelular, para então iniciar um novo ciclo de infecção nas células vizinhas (Da Costa, V. *et al*. 2020; Fiuza, L. *et al*. 2020). (Figura 2: Ciclo de replicação SARS-CoV-2.)

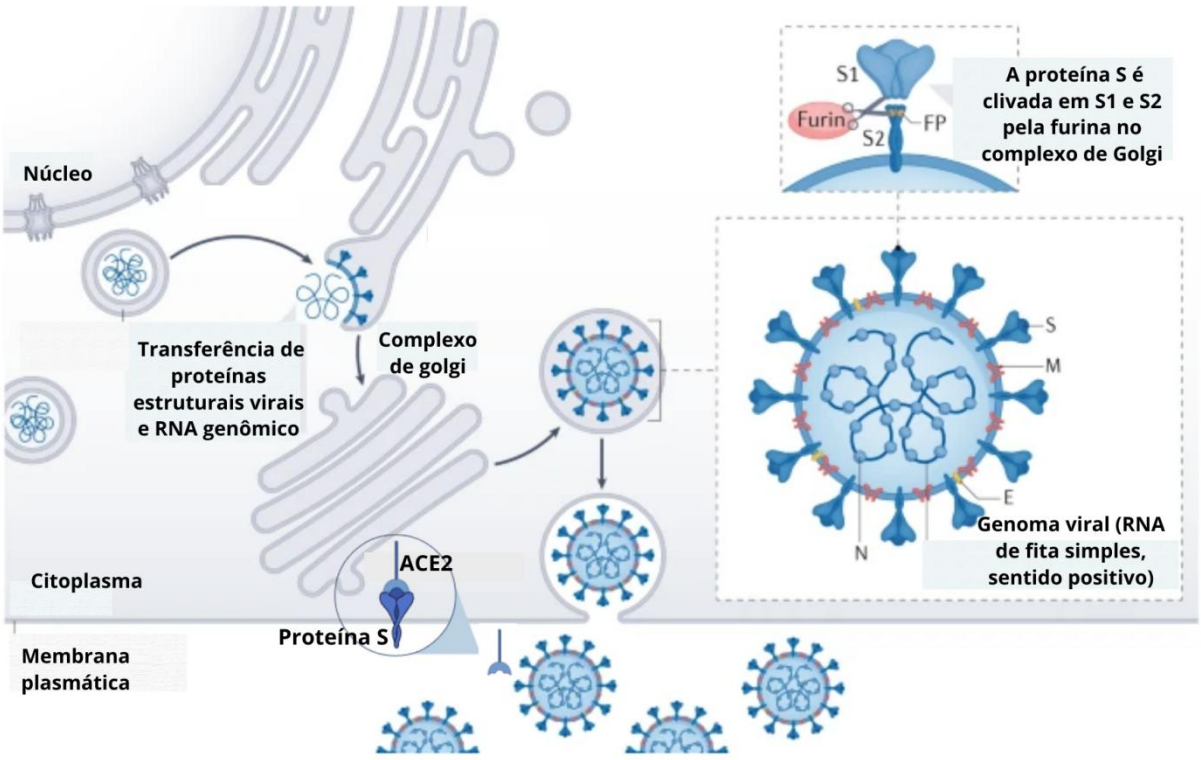

Figura 2: Ciclo de replicação SARS-CoV-2. Primeiramente, o SARS-CoV-2 se adere às mucosas através da ligação entre a proteína S (Spike) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), após essa ligação, a penetração ocorre por endocitose e na sequência, por meio da ação da furina, a formação de 2 subunidades funcionais da proteína S modificada, sendo a subunidade S1 determinante do tropismo celular e a S2 responsável pela mediação da fusão da membrana celular e o vírus. O desnudamento e a liberação do genoma viral ocorrem após a formação do endossomo, e a proteína S sofre uma nova modificação promovendo a liberação do material genético viral, que é prontamente traduzido devido sua configuração em RNA de fita simples e sentido positivo. Após esse passo, ocorre então o processamento de proteínas funcionais que se tornam responsáveis pela replicação e transcrição do vírus e são produzidas novas fitas de RNA que são traduzidas em proteínas estruturais. Por fim, fitas de RNA genômico são geradas e posteriormente empacotadas em novos vírions recém formados que serão liberados por exocitose para o ambiente extracelular. (Fonte: Jackson, C. et al. 2022. Adaptado pela autora)

Um fator importante a se destacar sobre o SARS-CoV-2 é sua alta capacidade de adaptação a novos hospedeiros, que consequentemente, contribui para o surgimento de diferentes variantes associadas a mutações frequentes encontradas no vírus. Essas frequentes mutações são atribuídas ao seu material genético que é composto por RNA, o que colabora para sua plasticidade adaptativa, além disso, vários animais atuam como reservatórios naturais e hospedeiros intermediários. Outro fator associado a plasticidade molecular do vírus consiste na elevada flexibilidade de mutação na proteína S, especialmente a região de ligação ao receptor RBD (*Receptor Binding Domain*), sendo uma região crucial para interação entre o vírus e a célula hospedeira (Magazine, N. et al. 2022).

1.1.3 Patogênese

A infecção pelo SARS-COV-2, inicialmente, induz respostas imunes específicas e inespecíficas. O primeiro contato do vírus se dá com o trato respiratório superior, onde as células reconhecem o vírus através dos PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) para PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Os receptores celulares do tipo toll (TLR) desempenham um importante papel no reconhecimento do vírus recém inserido no organismo. No contexto da COVID-19, o receptor TLR4 que é expresso em células imunes como macrófagos, células dendríticas e endoteliais, destaca-se como um dos principais receptores envolvidos na detecção de PAMPs virais, todavia, outros receptores como TLR7 e TLR8 também podem fazer o reconhecimento do vírus SARS-CoV-2. Entre esses PAMPs,

destacam-se a proteína S e a proteína E que podem ser reconhecidas por PRRs de membrana, enquanto a proteína N é reconhecida por sua alta imunogenicidade, ativando PRRs endógenos, sendo uma indutora significativa da resposta imunológica contra o SARS-CoV-2. Seguido ao reconhecimento do vírus, a resposta imune inata é ativada de maneira coordenada e estimula vias importantes para a eliminação do vírus, ativando moléculas sinalizadoras como MyD88 e fatores de transcrição como NF-kB, resultando em uma elevada produção dos IFNS tipo 1 (Kayesh, M., Kohara, M.; Tshukiyama-Kohara, K. 2021; Gusev, E. et al. 2022; Primorac, D., *et al*. 2022).

Diversas vias de sinalização atuam no recrutamento de células no contexto infeccioso causado pelo vírus SARS-CoV-2. Além dos receptores do tipo toll, os PRRs pertencentes à família do RLR (receptores semelhantes ao RIG-I) reconhecem material genético viral e induzem vias de sinalização apoptóticas, como MAVS, que culmina na produção e ativação de complexos protéicos envolvidos na eliminação do vírus invasor. Receptores do tipo NLR também podem ser ativados, induzindo a formação de inflamassomas, os quais promovem a piroptose e secreção de mediadores inflamatórios como IL-1b e IL-18. Como consequência dessas respostas iniciais do sistema imunológico, DAMPs (padrões moleculares associados a danos) são gerados, atuando na sinalização e recrutando diversas células imunes para o local da inflamação (Gusev, E. et al. 2022). Os macrófagos alveolares podem ser ativados e agir através de liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, induzindo uma mudança no endotélio alveolar, contribuindo para resposta inflamatória local. (Primorac, D., *et al*. 2022).

O termo “tempestade de citocinas”, foi empregado no contexto da infecção por SARS-CoV-2 para definir uma característica de processo inflamatório que envolve uma diversidade, e em grandes quantidades, de mediadores pró-inflamatórios responsáveis por uma hiperativação da resposta imunológica. Estudos prévios demonstraram que pacientes em fase aguda da doença, especialmente aqueles com evolução para quadros graves, apresentaram elevadas concentrações de citocinas, incluindo TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-4 e IL-10, moléculas essenciais para o recrutamento de células imunes efetoras (Zanza, C. et al. 2022). Além disso, altos níveis de quimiocinas como CCL2 e CCL5, têm sido correlacionados com maior gravidade da doença. Esses mediadores são secretadas por diversas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, linfócitos e células dendríticas, em um mecanismo de retroalimentação, no qual as próprias células recrutadas pelos mediadores, estimulam o

recrutamento de novas células para o sítio infeccioso, amplificando a resposta imunológica (Tang, Y. et al. 2020).

Considerando esse contexto, altas quantidades da quimiocina CXCL10 atuam diretamente no recrutamento de monócitos, que ocorre de maneira rápida e em altos números. Na COVID-19, observa-se uma liberação elevada e anômala de monócitos pela medula óssea, seguida de sua migração para outros tecidos, um processo associado à maior gravidade clínica da doença. Após a saída da medula óssea, posteriormente, os monócitos podem se diferenciar em células dendríticas, que desempenham um papel central na apresentação de antígeno e na ativação da resposta imune adaptativa. Além disso, nos tecidos periféricos, os monócitos também podem se diferenciar em macrófagos (Scott, N. et al. 2023).

Os neutrófilos também são recrutados para o local da inflamação, e desempenham um papel crucial na resposta inflamatória durante a infecção por SARS-CoV-2, atuando principalmente na fagocitose de células infectadas. Todavia, em uma resposta imune desregulada, podem contribuir para a exacerbação da reação inflamatória, frequentemente atribuída à COVID-19. Isso ocorre através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, que, quando excessivamente liberados, podem causar danos significativos aos tecidos. No caso da infecção pulmonar, como demonstrado na figura 3, o dano no tecido pulmonar resulta em uma perda da compartimentalização local, o que agrava a condição dos pacientes permitindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios para a circulação. Esse processo afeta outros órgãos, podendo causar danos irreversíveis e, em casos extremos, levar ao óbito (Voiriot, G. *et al*. 2022). (Figura 3: Respostas imunológicas do hospedeiro durante infecção por SARS-CoV-2)

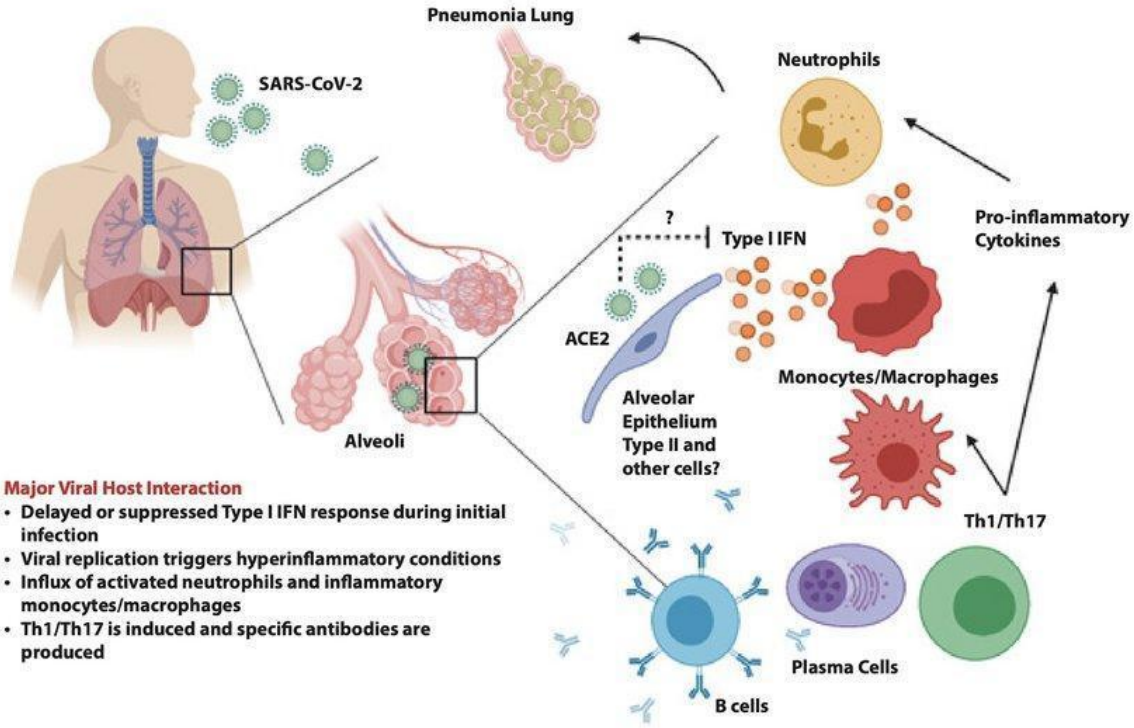

Figura 3: Resposta imunológica do hospedeiro durante infecção por SARS-CoV-2. O primeiro contato do SARS-CoV-2 ocorre por meio de aerossóis e resulta na internalização do vírus em células-alvo que expressam a ACE2, como células alveolares. A infecção pode resultar na supressão das respostas antivirais mediadas por interferon (IFN), levando a uma alta taxa de replicação viral. Um influxo de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção resulta em uma hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias, que está frequentemente associado à imunopatologia do pulmão. As células T auxiliares (Th1/Th17) podem ser ativadas, o que contribui significativamente para amplificação da resposta inflamatória. Anticorpos específicos são produzidos pelas células B e células plasmáticas, como um papel fundamental na neutralização do vírus, contribuindo para a resposta imunológica contra a infecção por SARS-CoV-2. (FONTE: Prompetchara, E. *et al*. 2020)

Outras células também estão envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imunológico, dentre elas, destacam-se as células apresentadoras de antígeno, que desempenham um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa, sendo as células dendríticas (CD) as principais células que atuam nessa função. As CD são consideradas as principais ativadores de células T, uma vez que possuem alta eficiência na apresentação de antígenos por meio de MHC (complexo de histocompatibilidade), sendo uma interação fundamental para amplitude e especificidade da resposta imunológica (Moss, P. 2022; Masopust, D., Ahmed, R. 2004).

O MHC possui 3 classes, sendo que as classes I e II são as que possuem ação nesse contexto de infecção. As moléculas do complexo MHC de classe I são expressas em diversas células de mamíferos e são específicas para cada hospedeiro, elas agem apresentando antígenos para os linfócitos T CD8+ em exposição a microrganismos intracelulares. Em contraste, o MHC de classe II tem sua ação em exposição a microrganismos extracelulares e são expressos em células dendríticas e macrófagos para uma outra classe de linfócitos que seriam os linfócitos T CD4+, que se tratam dos linfócitos auxiliares. Essas células linfocitárias são cruciais para uma resposta efetiva do sistema imune frente a infecção por patógeno (Moss, P. 2022).

Uma das primeiras etapas da ativação da resposta imune adaptativa envolve a ativação das células T CD8 por meio do MHC-I, onde ocorre o processo de ativação e proliferação dessas células, conferindo então a citotoxidade celular. Essa ação citotóxica ocorre através da liberação de perforinas que formam poros na membrana celular, favorecendo a entrada de granzimas, que são enzimas proteóliticas que possuem capacidade de induzir a morte celular, contribuindo para uma resposta imune eficaz frente a uma ampla gama de agentes patogênicos (Gozzi-Silva, S. *et al.* 2022; Pascoal, D. *et al.* 2020). No âmbito da COVID-19, já foi demonstrado uma alta expressão de células TCD8 e seus produtos citotóxicos, que desempenham um papel fundamental na eliminação do patógeno. Todavia, essa alta ativação também contribui para a exacerbação do processo inflamatório, resultando em danos às células do tecido do hospedeiro através da hipercitotoxicidade, correlacionando a elevada ativação dessas células com maior gravidade da doença (Santa Cruz, A. *et al*. 2023).

As células T CD4 também desempenham um papel crucial na resposta imunológica ao SARS-CoV-2, sendo que essas células interagem com o MHC-II das células apresentadoras de antígeno, desencadeando uma resposta imune adaptativa específica para o antígeno viral (Bertoletti, A. *et al*. 2022). Após a ativação das células T CD4, algumas dessas células se diferenciam em células T foliculares helper (Tfp), como Th1, Th2, Th17 e Treg (T reguladoras). A diferenciação celular dos linfócitos TCD4 em perfil Th1 podem atuar de forma pró-inflamatória, com a produção de interleucinas ou na indução da imunidade humoral através do perfil Th2, enquanto o papel da Th17 foi associado a hiperinflamação (Primorac, D., *et al.* 2022; Sadeghi, A. *et al*. 2021). No contexto da COVID-19, a resposta imune mediada por células TCD4 foi associada a sua diferenciação para o perfil Th1, que possui atividade antiviral, e atua na eliminação do vírus principalmente através da liberação de interleucinas, promovendo a sinalização e recrutamento de outras células do sistema imune.

Além disso, essas células também demonstraram ser importantes para a indução de imunidade após a infecção, protegendo o hospedeiro contra as reinfecções (Koblischke, M. *et al*. 2020).

As células TCD4 também podem se diferenciar em células Treg (T reguladoras), que possuem uma importante função na regulação da resposta imune, prevenindo uma resposta auto imune do indivíduo e também atenuando ou inibindo uma resposta inflamatória exacerbada, que pode ser observada na COVID-19 (Wang, Y., *et al*. 2021). Essas células possuem ação anti-inflamatória através da liberação de citocinas como a TGF-β, IL-10 e IL-35, e tem como marcador o fator de transcrição FOXP3, que por sua vez possui um papel importante no progresso e diferenciação dessas células. A ação das células Treg é essencial para evitar grandes danos teciduais derivados da ação inflamatória em pacientes acometidos pela COVID-19, todavia, não se sabe o quanto elas podem influenciar a resposta do sistema imunológico em uma infecção posterior ao COVID-19, sendo que sua ação leva a uma redução da resposta imune celular (Sadeghi, A. *et al*. 2021).

Toda a dinâmica da resposta imune desenvolvida pelo organismo do hospedeiro, se ativada de maneira correta, confere uma proteção e combate à doença induzida pelo vírus. Todavia, o retorno à homeostase do organismo depende de uma série de fatores associados à patogênese da doença, que ainda permanecem insuficientemente elucidados.

1.1.4 Sintomatologia

A apresentação da infecção por SARS-COV-2 pode variar de assintomática até casos com manifestações graves e potencial de levar a óbito (Firouzabadi, Negar *et al*. 2023). Na COVID aguda os sintomas começam a aparecer entre 4 a 5 dias após a exposição ao vírus SARS-CoV-2, o tempo até a recuperação pode diversificar de acordo com a variante, mas na maioria dos casos a recuperação dura cerca de 7 a 10 dias, podendo chegar de 3-6 semanas. Os sintomas inicialmente variam entre febre, tosse, dor de garganta, mialgia, alguns distúrbios gastrointestinais e sintomas respiratórios brandos ou graves, como dificuldade respiratória. Todavia, com o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2, os sintomas clínicos demonstraram diferentes padrões. Sintomas como ageusia, anosmia e distúrbios gastrointestinais foram mais comumente associados às primeiras ondas da pandemia, que contemplam as variantes Gamma e Delta, sendo menos recorrente em infecções causadas pela variante Ômicron (Docherty, A., *et al*. 2020; Mark, W. *et al*. 2020; Gomes, B. *et al.* 2024).

A manifestação assintomática da doença após infecção com vírus SARS-CoV-2, representa um desafio significativo para a obtenção de dados precisos sobre a real prevalência de infecções, bem como a associação de sintomas posteriores em pessoas previamente expostas ao vírus (Raveendran, A., *et al*. 2021). Outro fator relevante a ser considerado é o surgimento de sintomas neurológicos como depressão e ansiedade, frequentemente relatados, e especialmente por profissionais de saúde, destacando a necessidade de uma abordagem multidisciplinar no manejo dessa doença (De Oliveira, *et al*. 2024).

Com o decorrer do tempo, observou-se que uma parcela significativa da população passou a relatar sintomas persistentes ou novos, meses após a infecção pelo SARS-CoV-2. Inicialmente, a associação desses sintomas com a infecção viral apresentou desafios, dado seu caráter inespecífico e a possibilidade de estarem relacionados a outras condições pré-existentes ou concomitantes. Entretanto, análises epidemiológicas demonstraram um aumento relativo na ocorrência desses sintomas após a pandemia, com uma relação consistente entre os sintomas apresentados no período agudo da infecção. Essas evidências permitiram estabelecer uma correlação entre tais manifestações clínicas e possíveis sequelas decorrentes da infecção pelo SARS-CoV-2, atualmente reconhecidas como COVID longa (Rutjanawech, S., *et al*. 2024).

1.2 Desenvolvimento da COVID longa e sua influência na resposta imunológica

A COVID longa (CL) ou também conhecida como síndrome pós-COVID, foi definida pelo CDC/EUA (*Centers for disease control and prevention*), como uma condição crônica que se manifesta após infecção por SARS-CoV-2. Raveendran e colaboradores destacaram em seu trabalho que essa condição independente da carga viral, presença do vírus ou de produto viral, onde mesmo na ausência de vírus circulante no hospedeiro o mesmo apresenta sintomas provenientes da exposição ao vírus SARS-CoV-2 (Raveendran, A., *et al*. 2021). Sendo importante destacar que a COVID aguda grave é um fator relevante, porém não é determinante para o desenvolvimento da CL (Garg, M., *et al*. 2021).

Os sintomas da CL são variados e tem seu início, na maior parte dos casos, após cerca de 4 semanas do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 podendo se estender por vários meses (Rutjanawech, S., *et al*. 2024). Os sintomas mais observados estão associados com a prevalência dos mesmos presenciados na COVID aguda, destacando-se os sintomas associados ao trato respiratório, como tosse e dispneia, causados pelo comprometimento da troca gasosa. Todavia, também foram relatados novos sintomas com diversos níveis de

gravidade, sendo que esses sintomas podem ser neurológicos como cefaléia, esquecimento, comprometimento cognitivo, anosmia e ageusia. Sintomas cardíacos, no trato gastrointestinal, reprodutivo e diversos outros órgãos também foram relatados por indivíduos acometidos pela CL, demonstrando o envolvimento sistêmico que torna essa doença de difícil diagnóstico (Rutjanawech, S., *et al*. 2024; Davis, Hannah E. *et al*. 2023). Apesar de em sua maioria, os sintomas se apresentarem de maneira branda, alguns indivíduos sofreram agravamentos do quadro clínico e desenvolveram trombose associado a hipercoagulabilidade, complicações cardíacas graves e até mesmo o desenvolvimento de AVC (acidente vascular cerebral) em determinados casos (Fan, B., *et al*. 2021).

Dentre a diversidade de consequências provenientes da infecção por SARS-CoV-2, destacam-se as alterações no sistema imunológico, sendo que essas podem influenciar de maneira direta na manutenção dos sintomas ou aparecimento de novos sintomas, bem como na gravidade do curso da doença. A resposta inflamatória excessiva, caracterizada por um aumento desregulado de mediadores pró-inflamatórios e alta atividade de células efetoras, já descrita na COVID aguda, persiste em indivíduos que desenvolvem a CL (Peluso, M. *et al*. 2024; Davis, H. *et al*. 2023).

Essa desregulação imunológica persistente é corroborada por mudanças específicas nas populações celulares do sistema imunológico. Por exemplo, o aumento de células mieloides foi determinado como um fator importante para o desenvolvimento dos sintomas da COVID longa, isso se deve pela atividade inflamatória excessiva nos órgãos mais afetados pela infecção do vírus SARS-CoV-2. Células como neutrófilos também desempenham um papel crucial no desenvolvimento da COVID longa, sendo que já foi demonstrado que sua alta atividade está presente em indivíduos sintomáticos. Todavia, outras células podem se apresentar de maneira reduzida no contexto desta doença, como as células Natural Killer (NK), onde em um estudo recente, a redução no número dessas células foi correlacionado com maior gravidade da doença (Peluso, M. *et al*. 2024). Contudo, os mecanismos associados ao aumento ou diminuição dessas células ainda não foram suficientemente elucidados.

Recentemente foi demonstrado que as células TCD4 voltam a sua normalidade após algumas semanas da infecção aguda, em contraste com esses resultados, as células TCD8 se mantiveram ativadas com alta expressão de perforinas por um período mais prolongado, resultado que independente dos sintomas apresentados na fase aguda. Conhecendo o perfil citotóxico das células TCD8, sabe-se que o aumento de seus produtos como granzimas e

perforinas possui um papel crucial na manutenção da resposta inflamatória com dano locais ou sistêmicos (Shuwa, H. *et al*. 2021; Santa Cruz, A. *et al*. 2023).

Um estudo realizado por Hernández-Aceituno e colaboradores, destacou a redução de casos de COVID longa associada a indivíduos infectados com a variante Ômicron, fato que pode estar diretamente relacionado ao curso da doença que essa variante induz, sendo mais brando e com menores necessidades de cuidados hospitalares. Porém, também foi apontado nesse estudo que variantes anteriores como a cepa original de Wuhan e a variante Alpha estão associadas a maior prevalência de CL. Esse fato, possivelmente está associado a ausência de vacinação e consequente maior gravidade da doença (Hernández-Aceituno, A., García-Hernández, A., Larumbe-Zabala, E., 2023).

Pacientes que passaram por um longo período de hospitalização apresentam também maior probabilidade de desenvolvimento da COVID longa, fato esse que pode estar associado a danos teciduais causados pelo agravamento da doença e também pela exposição a uma diversidade de medicamentos, que pode levar a disbiose, e consequentemente a maior suscetibilidade a infecções oportunistas. Estudos prévios demonstram que pacientes que contraíram a COVID-19, posteriormente, são mais susceptíveis tanto a infecções fúngicas como bacterianas (Garg, M., *et al*. 2021; Silva, D. *et al*, 2021).

A resposta inflamatória exacerbada que ocorre na fase aguda da infecção pode persistir meses após a infecção, contribuindo para o desenvolvimento da CL e possível aumento de suscetibilidade à infecção, onde em um estudo recente, a redução no número dessas células foi correlacionado a doença grave posterior. A resposta inflamatória exacerbada está associada a uma alta atividade de células com consequente aumento da liberação de mediadores inflamatórios, com prevalência de mediadores pró-inflamatórios em relação a mediadores anti-inflamatórios (Silva-Junior, A., *et al*. 2024; Almulla, A., *et al*, 2024). Além disso, é descrito na literatura correlação positiva entre o aumento de suscetibilidade e agravamento de infecções pulmonares em pacientes que apresentaram previamente alguma doença crônica pulmonar, como por exemplo, a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), com características de enfisema (Cavallazzi, R.; Ramirez J. 2020).

A DPOC é um fator de risco para o agravamento do quadro clínico de pacientes infectados por SARS-COV2, chegando a números alarmantes como a probabilidade 7 vezes maior desses pacientes serem levados ao óbito em condições de internação hospitalar. Além da própria fragilidade ligada ao comprometimento da função pulmonar, mecanismos

biológicos ligados à exposição a fumaça frequente nesse grupo específico se associam a pré-disposição desses pacientes a contraírem a COVID-19, pelo aumento da expressão da enzima ACE-2 induzida por mediadores inflamatórios (Sheikh, D. *et al*. 2022). Dessa forma, visto que a DPOC torna as funções pulmonares do paciente mais comprometidas durante a fase aguda da doença, o DPOC também poderá ser um fator de predisposição para CL (Awatade, N. *et al*. 2023).

Evidências indicam que durante a fase aguda da doença, indivíduos infectados por SARS-CoV-2 demonstram um aumento na prevalência de infecções secundárias, causadas por outros vírus, bactérias ou fungos, com maior incidência em ambientes hospitalares (Kurra, N. et al. 2022). A ocorrência de infecções fúngicas secundárias de origem hospitalar tem sido associada a maiores taxas de mortalidade, destacando entre esse grupo a *C. albicans* (Hoenigl, M., *et al*. 2022; Abdoli, A., Falahi, S., Kenarkoohi, A. 2022). Além disso, no contexto da COVID longa, estudos demonstraram que após um período da infecção por SARS-CoV-2 há um aumento na incidência de infecções por *C. albicans*, o que sugere que a infecção inicial por SARS-CoV-2 pode contribuir na vulnerabilidade ao desenvolvimento de candidíase (Bistagnino, F. et al. 2024.).

1.3 Modelo de infecção murino de coronavirose

Estudo publicado por nosso e outros grupos de pesquisa, compararam a infecção por SARS-CoV e o MHV (*Murine hepatite vírus*), que além de compartilharem o mesmo gênero, também apresentam diversas semelhanças em seu material genético, ciclo de replicação viral, e na patogênese de suas infecções. O MHV induz uma diversidade de infecções que podem ser comparadas ao SARS-CoV, como infecções respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas, todavia, como diferença ao SARS-CoV, o coronavírus murino apresenta um forte tropismo pelo fígado (Korner, R., *et al*. 2020; Yiqi, L., *et al*. 1995). Outra diferença descrita entre o MHV e o SARS-CoV está na ligação entre o vírus e a célula-alvo, sendo que o MHV utiliza o receptor CEACAM1a para penetrar na célula do hospedeiro, diferente do observado no SARS-CoV-2 que utiliza o ACE2 como via de infecção (Chen, C., *et al*. 2004).

Um fator interessante para o uso do MHV está em sua praticidade para utilização em modelo *in vivo*, pois apresenta nível de biossegurança NB2 enquanto o SARS-CoV-2 necessita de laboratório NB3 para sua manipulação, sendo assim, a utilização do MHV se torna mais adequada para estudos pré-clínicos iniciais (Andrade, A. *et al*. 2021).

Yang e colaboradores demonstraram que existe uma ausência em modelos que mimetize de melhor forma a CL. Todavia MHV-A59 demonstrou eficácia na infecção pulmonar em inóculo administrado via intranasal, e adequado para avaliação de parâmetros inflamatórios, sendo os camundongos da linhagem C57BL/6J animais suscetíveis à infecção (Yang, Z *et al*. 2014). Outras linhagens do MHV como o MHV-3 também resultam em infecção pulmonar semelhante ao encontrado no SARS-CoV-2, também justificando sua utilização como modelo. Contudo, a infecção com MHV-3 induz a manifestações sistêmicas com rápida mortalidade nos animais, não viabilizando sua utilização para modelo de COVID longa, onde existe a necessidade de períodos mais longos após infecção para avaliação tardia de parâmetros inflamatórios (Andrade, A. *et al*. 2021).

O MHV-A59 administrado via intranasal, em doses subletais, induz lesões pulmonares e alterações em parâmetros inflamatórios característicos de infecção por coronavírus, semelhante à achados de pneumonite aguda, permitindo avaliação dos parâmetros inflamatórios tardios persistentes após a infecção (Yang, Z *et al*. 2014). Além disso, esse modelo nos permite avaliar o efeito da infecção por coronavírus na resposta do hospedeiro durante a CL a outros patógenos.

1.4 *Candida albicans* como infecção oportunista

A *Candida albicans* pertence à família *Cryptococcaceae* e à ordem Saccharomycetales, e é um microrganismo comumente presente na microbiota de indivíduos saudáveis. Essa levedura possui a habilidade de formação de biofilme, e embora seja considerada um microrganismo comensal, a *C. albicans* pode se tornar patogênica em hospedeiros com deficiência imunológica, comorbidades ou disbiose. Nos Estados Unidos representa a terceira ou quarta causa mais comum de infecções invasivas (Seelbinder, B. *et al*. 2023; Noble, S. *et al*. 2017). Por se tratar de um microrganismo ubíquo, também é abundantemente identificado em ambientes hospitalares, desenvolvendo mecanismos de resistência a antifúngicos tradicionalmente utilizados (Silva, D. *et al*, 2021; Lionakis, M.S. *et al*, 2023).

Esse fungo é considerado como pleiomórfico, e sua divisão é predominantemente assexuada através de brotamento de seus blastosporo. A composição de sua parede celular é de quitina, glucana e proteínas que são responsáveis por conferir proteção a célula dessa levedura e também auxiliam na adesão da célula ao hospedeiro (Talapko J.; *et al*. 2021). Devido a sua ampla variedade morfológica, a virulência deste microrganismo está intimamente associada à sua morfologia, que garante uma melhor adaptação de suas células a

uma diversidade de ambientes, sendo a transformação da forma leveduriforme para forma filamentosa um importante fator para a indução da doença invasiva causada por *C. albicans* (Talapko J.; *et al*. 2021). Essa plasticidade morfológica onde a célula leveduriforme se transforma em filamentosa é induzida através do contato com a célula hospedeira, sendo que esse fungo possui capacidade de auto indução de formação de hifas. Todavia, o polimorfismo pode também ocorrer por meio de sinais ambientais como alteração de pH, sendo que pH acima de 7 leva a indução do crescimento de hifas. A regulação morfológica desse fungo também pode ser regulada através de *quoron sensing,* um mecanismo utilizado para comunicação microbiana (Mayer, F.; *et al*. 2013).

A capacidade de adesão de *Candida albicans* é amplamente reconhecida como um fator crítico de virulência, uma vez que o fungo utiliza adesinas para aderir e colonizar tanto superfícies bióticas quanto abióticas. No epitélio, as células de *C. albicans* inicialmente aderem na forma de levedura, posteriormente, podendo invadir outros tecidos por meio da formação de hifas. Em casos de candidemia, essa expansão pode permitir o acesso aos vasos sanguíneos, resultando em uma disseminação sistêmica pelo organismo. Após aderir às células hospedeiras via endocitose, a *C. albicans* utiliza proteinases aspárticas (Saps) para promover danos às células epiteliais, recrutar leucócitos e induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1β e TNF. Além disso, a *C. albicans* produz candidalisina, uma toxina que forma poros na membrana das células hospedeiras, comprometendo a integridade tecidual. Fatores adicionais, como adaptação nutricional, resistência a variações de pH e temperatura, evasão do sistema imunológico e resistência a medicamentos, também desempenham papéis fundamentais na eficácia da infecção causada por esse fungo (Lopes, J., Lionakis, M. 2022).

Diversos PRRs estão envolvidos no reconhecimento da *C. albicans*, entre eles, os receptores do tipo toll, localizados na membrana plasmática da célula hospedeira desempenham um papel crucial no reconhecimento da presença de *C. albicans* no organismo hospedeiro. No entanto, devido a estrutura de sua parede celular, também pode ser reconhecida por receptores de C-lectina (CLRs), sendo o reconhecimento através desse receptor fundamental para a eliminação deste microrganismo. A interação de *C. albicans* com os PRRs desencadeia a ativação de importantes vias de sinalização intracelular, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL-18. Essas citocinas desempenham um papel central no recrutamento de diferentes células inmunológicas, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, que cooperam para montar uma resposta imune robusta

contra a infecção. Assim, a ativação coordenada desses receptores e suas respectivas vias de sinalização é fundamental para o controle e eliminação de *C. albicans* pelo sistema imunológico do hospedeiro. Células do sistema imune adaptativo, como os linfócitos T, também desempenham um importante papel na defesa contra esse patógeno, tanto na destruição direta do microrganismo quanto na regulação pró e anti-inflamatória (Swidergall, M., Leibund, S. 2022).

Delisle e colaboradores demonstraram em seu estudo com pacientes que passaram por longo de internação na UTI, a prevalência da infecção de *Candida* spp. em secreções do trato respiratório, que na maioria dos casos, os mesmos foram expostos a longos períodos de internação e uso de ventilação mecânica. Os resultados observados demonstraram também uma correlação de maior mortalidade no grupo que apresentou colonização desse fungo no trato respiratório. Isso se torna um ponto importante para demonstrar a necessidade de estudos atuais sobre a infecção desse fungo no trato respiratório, visto que a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 levou diversos indivíduos à exposição a esses fatores de risco (Delisle, Marie-Soleil et al. 2008). Sendo assim, já é bem documentado em pacientes com infecção aguda por SARS-COV-2 são mais susceptíveis a infecção por *C. albicans.* Contudo, o aumento de susceptibilidade a essa levedura ainda não foi claramente demonstrada durante a CL nem tampouco como as alterações no perfil de ativação celular durante a CL interferem na resposta à infecção por *C. albicans*.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Vários estudos têm relatado o fato de que uma proporção considerável de pacientes convalescentes da infecção por SARS-CoV-2 tem desenvolvido a COVID longa, apresentando manifestações clínicas prolongadas. No entanto, não está suficientemente claro se as alterações no sistema imune adaptativo induzido pelo SARS-CoV-2 podem se prolongar pelo período pós-COVID, contribuindo para o aumento da suscetibilidade a infecções oportunistas.

Atualmente, é de grande relevância o estudo da possível suscetibilidade ou agravamento associado a patógenos de importância clínica em indivíduos que passaram pela infecção de COVID-19. Nesse contexto, optamos por utilizar a *Candida albicans* como modelo de segundo estímulo devido a sua ubiquidade como microrganismo, seu status como componente da microbiota normal do hospedeiro, associação com infecções humanas comuns com alta letalidade e alta incidência de co-infecções em pacientes com COVID aguda grave.

Tendo em vista o exposto acima, a hipótese do presente trabalho é que infecção por coronavírus murino leva a uma alteração do perfil de ativação de células T, com aumento de células T efetoras e diminuição de celulas T reguladoras, o que torna o hospedeiro mais suscetível ao agravamento frente à uma infecção secundária por *Candida albicans*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da COVID longa na gravidade da infecção pulmonar por *Candida albicans,* utilizando um modelo murino de infecção.

3.2 Objetivos específicos

I. Caracterizar a cinética de ativação de células T reguladoras e efetoras induzidas pela infecção por *C. albicans* em animais previamente infectados com MHV-A59.

II. Avaliar as alterações histopatológicas pulmonares induzidas pela infecção por *C. albicans* em animais previamente infectados com MHV-A59.

III. Verificar se a recuperação de *C. albicans* no pulmão de animais é alterada pela infecção prévia com MHV-A59.

IV. Avaliar o influxo de neutrófilos e a produção de quimiocinas induzidos pela infecção por *C. albicans* em animais previamente infectados com MHV-A59.

V. Avaliar as alterações na função pulmonar induzidas pela infecção por *C. albicans* em animais previamente infectados com MHV-A59.

4. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA

4.1 Animais e microrganismos

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados animais C57/BL6 fêmeas com idade entre 5-6 semanas após aprovação do comitê de ética para uso de animais em pesquisa/UFMG com o respectivo CEUA 177/2024 .

A inoculação de MHV-A59 foi realizada por via intranasal em condições estéreis (Andrade, A. *et al*. 2021). Os animais foram anestesiados com uma solução contendo xilazina (15mg/Kg) e cetamina (80mg/Kg) diluída em PBS 1X de forma subcutânea, no volume de 80µl. O animal anestesiado foi posicionado com a cabeça elevada e o inóculo de $1x10^4$ PFU/animal de MHV-A59 (30µl) foi administrado na narina esquerda. Após esse processo, o animal ficou em recuperação e foi monitorado até o retorno dos movimentos. Posteriormente, os animais foram acompanhados nos tempos determinados de acordo com cada delineamento experimental, sendo por 7 dias no primeiro experimento, 21 dias no experimento seguinte e 21 dias no experimento final, onde foram infectados com *Candida albicans*.

A linhagem da *Candida albicans* utilizada para infecção dos animais no presente estudo foi a ATCC SC5314. Para preparo do inóculo, no dia anterior ao procedimento de infecção, 50µl do inóculo do estoque de *C. albicans* foi adicionado a 50mL de caldo Sabouraud em um Falcon estéril e levado ao *shaker* em temperatura aproximada de 37ºC a 150/180 RPM *overnight*. No dia seguinte o Falcon é retirado do *shaker* e centrifugado por 8 minutos em 5488g em temperatura a 4ºC. Em seguida, o sobrenadante foi dispensado e o pellet diluído em 5mL de salina. A contagem de células foi efetuada na câmara de Neubauer e o cálculo realizado para acertar o inóculo em $1x10^6$ CFU/mL.

O procedimento para infecção utilizando *C. albicans* foi realizado via intra-traqueal. Para isso, nos animais anestesiados, como descrito acima, foi feito uma pequena incisão acima do externo para melhor observação da traqueia, e após a exposição da traquéia, com uma seringa de vidro de 50uL e uma agulha de 18g, com o bisel voltado para cima em movimento vertical a agulha foi inserida na traquéia e injetado lentamente 30µl de $1x10^6$ CFU/animal. A seguir foi feita uma sutura para fechar a incisão e os animais foram acompanhados pós-cirúrgico até a recuperação.

4.2 Infecção e pós-infecção

Foram utilizados inicialmente dois protocolos para modelo "*two-hit*" de infecção. Para isto, foi empregado o uso de animais divididos em 4 grupos com N amostral de 4-6 animais, sendo esses grupos: NI (não infectados), infectados com *Candida albicans* (grupo Ca), infectados com MHV-A59 (grupo MHV) e infectados com MHV-A59 e *C. albicans* (M+C) (**Figura 4:** Delineamento experimental dos tempos de infecções.).

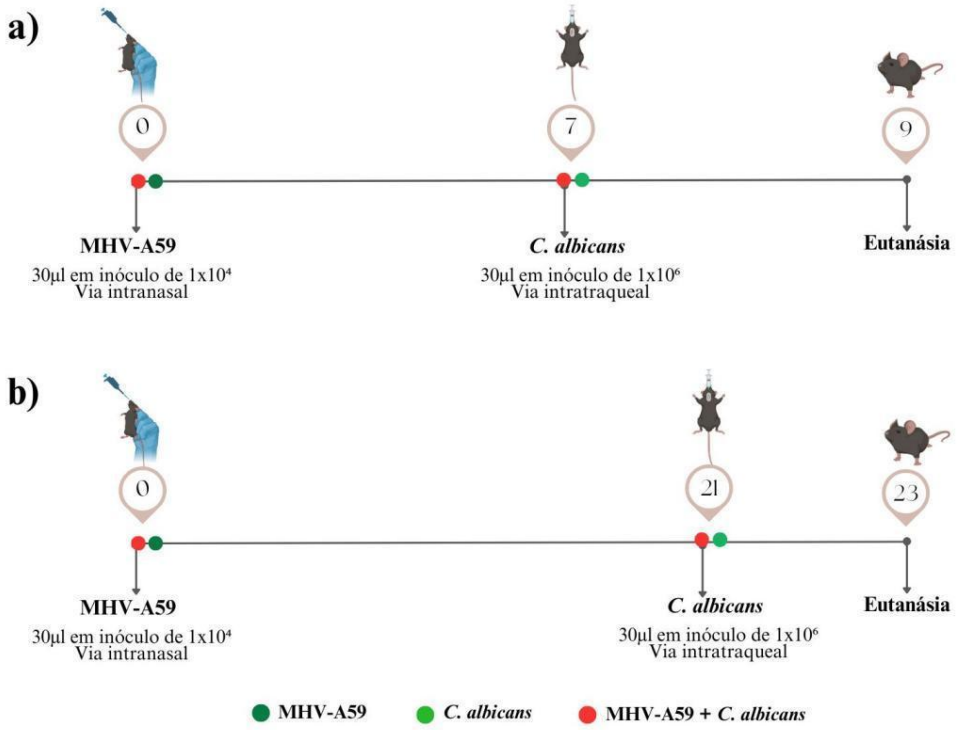

Figura 4: Delineamento experimental dos tempos de infecções. Em experimento inicial, foram utilizados 24 animais divididos em 4 grupos com N de 6, sendo: NI (grupo não infectado), MHV (grupo infectado com MHV-A59), Ca (grupo infectado com *C. albicans*), M+C (grupo previamente infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C.albicans*). No dia 0 foi realizada a infecção com MHV-A59 no grupo MHV e no grupo M+C, os animais foram acompanhados e no dia 07 foi realizada a infecção com a *C. albicans* (a), no dia 09 todos os grupos foram eutanasiados. Em experimento posterior utilizando o tempo mais tardio de infecção (b), mais 24 animais foram utilizados, divididos também em 4 grupos com N de 6. A infecção de MHV-A59 foi realizada no dia 0, os animais foram acompanhados, e a *C. albicans* administrada no dia 21, sendo a realização da eutanásia 2 dias após a infecção com *C. albicans* no dia 23. (Elaborado pelo autor)

Conforme o protocolo estabelecido para esse procedimento, primeiramente selecionamos os períodos de 9 dias para realização da eutanásia e coleta de amostras (Figura 4A). Neste primeiro momento, realizamos a infecção inicial com o coronavírus murino no

tempo 0 e os animais foram acompanhados por 7 dias, no sétimo dia foi realizado a infecção com o inóculo de *C. albicans*. Os animais foram eutanasiados 2 dias após a segunda infecção, considerando o tempo de 9dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*.

No segundo protocolo do presente modelo, estabelecemos um período mais longo de infecção onde os animais foram acompanhados por 23 dias até o momento da eutanásia e coleta de amostras (Figura 4B). Para isto, a infecção inicial com coronavírus murino foi realizada no tempo 0 e os animais acompanhados por 21 dias, onde no vigésimo primeiro dia foi realizada a infecção com a levedura *C. albicans* e após 2 dias os animais foram eutanasiados, considerando 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*.

Após eutanásia, foram coletados lavado broncoalveolar (BAL), que foi realizado por meio de 2 lavagens com 1 mL de PBS 1X estéril, pulmão, fígado, soro, rim e baço para análises posteriores.

Após análises prévias utilizando o modelo de infecção citado acima, optamos por avaliar a cinética de função pulmonar selecionando o tempo mais tardio de infecção por MHV-A59 como ponto de partida, e adicionando também um tempo mais tardio de infecção por *C. albicans.* Para tal experimento, utilizamos o tempo de 21 dpi de MHV-A59 para realizar a infecção por *C. albicans*, avaliando em 2 e 9 dpi de *C. albicans* e em 23-30 dpi de MHV-A59. Com a eutanásia inicial acontecendo em 23 dias de infecção com MHV-A59 e 2 dias de infecção por *C. albicans*, e uma eutanásia posterior 30 dias após infecção de MHV-A59 e 9 dias após infecção por *C. albicans* (Figura 5: Delineamento experimental de cinética em função pulmonar).

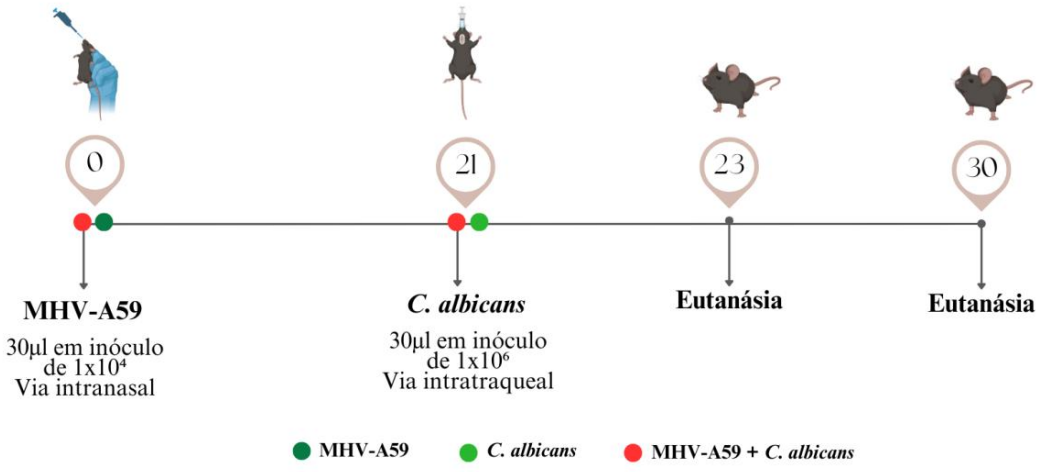

Figura 5: Delineamento experimental de cinética em função pulmonar. Utilizamos 42 animais, divididos em 7 grupos com N de 6 por grupo, sendo: NI (grupo não infectado), MHV 23 dpi(grupo infectado com MHV-A59), CA 2 dpi (grupo infectado com *C. albicans*), M+C 23 dpi MHV + 2 dpi CA (grupo previamente infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C.albicans*), MHV 30 dpi(grupo infectado com MHV-A59), CA 9 dpi (grupo infectado com *C. albicans*), M+C 30 dpi MHV + 9 dpi CA (grupo previamente infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C.albicans*) . No dia 0 foi realizada a infecção com MHV-A59 nos grupos MHV e nos grupos M+C, os animais foram acompanhados e no dia 21 foi realizada a infecção com a *C. albicans*, no dia 23 foram eutanasiados os primeiros grupos junto ao grupo NI. Os grupos restantes foram acompanhados por mais 7 dias e eutanasiados após 30 dias de experimento. (Elaborado pela autora)

4.3 Avaliação de carga viral

Para determinação de carga viral empregamos a técnica de titulação viral, e como amostras utilizamos pulmão, baço e fígado (Campolina-Silva, G. *et al*. 2023). Para isso, no dia anterior ao início da titulação, as células de cultura L929 foram preparadas em meio DMEM 10% em placas de 24 poços e armazenadas em estufa. No dia posterior foi conferido a confluência que necessariamente deve constar ~80% para dar continuidade ao experimento.

Para processamento das amostras, os órgãos são macerados em meio DMEM e cada amostra é preparada em 5 diluições e levada à estufa por 1 hora, agitando suavemente a placa a cada 15 minutos. Uma solução contendo meio DMEM e soro fetal bovino é adicionada em um volume de 8mL e as placas são armazenadas em estufa por aproximadamente 48 horas. Posterior ao período de incubação, o formaldeído 10% foi adicionado com o auxílio de uma pisseta em todos os poços e descartado vertendo a placa após 1 hora. Todos os procedimentos realizados até esse momento necessitam da utilização do fluxo laminar para evitar contaminações.

O cristal violeta utilizado para coloração do tapete celular foi adicionado e as placas armazenadas por 24 horas. Por fim, as placas foram lavadas com água e dispostas em uma bancada para que sequem naturalmente e realizar a leitura dos resultados.

4.4 Análise histológica de pulmão

Para análise histológica de pulmão, utilizamos amostras retiradas de todos os grupos do presente estudo. Primeiramente as amostras são coletadas cuidadosamente na eutanásia, evitando qualquer dano ao tecido que possa refletir posteriormente nas análises microscópicas.

Após serem retiradas na eutanásia, são imediatamente fixadas em formalina 10% pelo período aproximado de 48 horas e após esse período armazenadas em álcool 70% até o momento do processamento (Andrade, A. *et al*. 2021).

As amostras foram incorporadas em parafina e posteriormente cortadas cortadas em espessura de 5 μM. Em seguida, as amostras foram processadas utilizando diferentes concentrações de álcool e xilol e a coloração realizada com H&E (Hematoxilina-eosina). Foi realizada uma análise histopatológica às cegas e quantificado com um escore que vai de 0 a 5, sendo: 0 ausente (0%), 1 mínimo (1-20%), 2 leve (21-40%), 3 moderado (41-60%), 4 acentuado (61-80%), 5 grave (81-100%). Também foi realizada análise descritiva de achados histológicos.

4.5 Citometria de fluxo

Para quantificação de linfócitos foi utilizado o método de citometria de fluxo, onde as células são separadas através de suas características morfologicas marcadas com seus respectivos anticorpos. A citometria de fluxo foi realizada em células do BAL e do pulmão (Andrade, A. *et al*. 2021).

Para processamento do pulmão, imediatamente após a coleta o órgão foi pesado e em seguida armazenado em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino. A amostra de pulmão é cortada em pequenos pedaços com auxílio de uma tesoura e diluída em 1mL de solução de RPMI suplementado contendo DNase I e colagenase IV, em concentração 1x para DNase e 2x para colagenase IV. Em seguida, as amostras de pulmão são levadas ao shaker por 30 minutos a 37ºC para a digestão. Após os 30 minutos no shaker, a amostra é homogeneizada com o auxílio de uma seringa e agulha até que o conteúdo esteja visualmente mais líquido, demonstrando que o tecido está completamente digerido e as células separadas para marcação e análise. Posteriormente as amostras são lavadas com RPMI e centrifugadas a 300g a 4ºC e o sobrenadante é descartado. Para evitar interferência das hemácias nas análises, as amostras passam pelo processo de lise de hemácias com solução ACK em volume de 500 μl por amostra, aguarda-se 5 minutos e após esse período as amostras são lavadas com meio RPMI, centrifugadas e o sobrenadante é desprezado como no passo anterior. Após esse processo, as células são ressuspendidas em meio RPMI e adicionadas em volume de 100uL a placa de 96 poços de fundo “U”.

Para amostras de BAL, após a coleta o eppendorf de 2mL é centrifugado em 1600 rmp por 8 minutos, o sobrenadante é armazenado para análise posteriores e o pellet ressuspendido em BSA 3% e adicionado a placa de 96 poços em volume de 100µl por amostra. Já estando pronto para iniciar a marcação extracelular.

A marcação extracelular é iniciada com *Cell viability* e as células lavadas com BSA 0,5%, centrifugadas e descartado o sobrenadante. Em seguida adiciona-se a placa de 96 poços Fc Block e posteriormente o mix de anticorpos de superfície anti-CD45 (leucócitos totais), anti-CD3 (linfócitos totais), anti-CD4, anti-CD8. Foram utilizados também anticorpos anti-CD19 para excluir os linfócitos B da análise e CD11b para excluir outros leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, que podem interferir na análise final.

Para marcação intracelular, as células são fixadas com tampão de fixação próprio para FOX-P3 e permeabilizadas com Perm-Buffer. Em seguida, as células são incubadas com anticorpos anti-FOXP3 (Treg). A placa é centrifugada entre todos os processos e o sobrenadante descartado, restando o pellet de células, esse pellet por fim é ressuspendido em PBS-WASH (BSA 0,5%) e transferidas para os tubos de leitura.

As amostras são lidas no citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo V10 (Tree Star Inc). (Figura 6. Estratégia de gates consideradas em avaliação de citometria de fluxo)

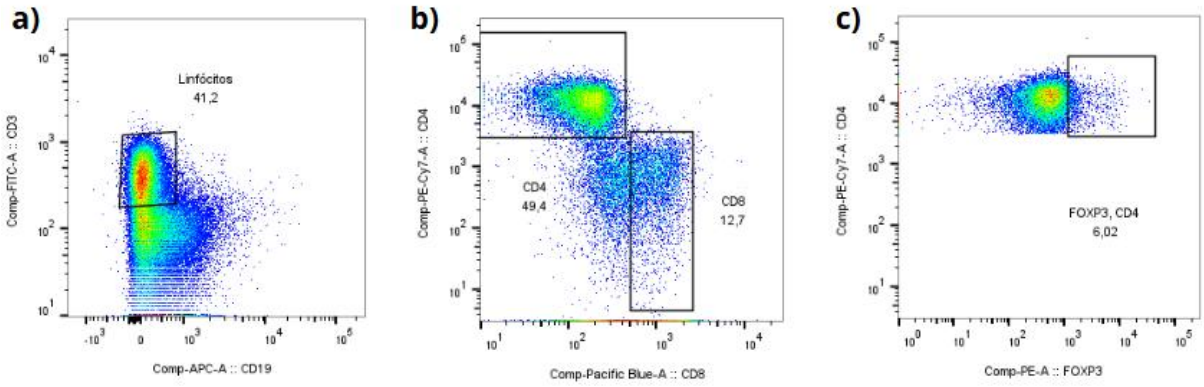

Figura 6. Estratégia de gates consideradas em avaliação de citometria de fluxo. O painel representa a estratégia de gates utilizadas para avaliação de linfócitos através de software FlowJo V10 (Tree Star Inc). A imagem (a) compreende a marcação para linfócitos totais, a imagem (b) linfócitos CD4 e CD8 e a imagem (c) células T reguladoras.

4.6 Quantificação de *C. albicans* por plaqueamento

A eutanásia é realizada em fluxo laminar para garantir um ambiente livre de contaminações. Após eutanásia as amostras de lavado broncoalveolar (BAL), pulmão, fígado e rim foram retiradas e armazenadas em eppendorf estéril previamente identificados. Em seguida, amostras de pulmão, fígado e rim foram processadas com o auxilio de uma seringa e realizada a diluição seriada em salina para cada tecido. Amostras de BAL não necessitam de processamento prévio, sendo apenas homogeneizadas e realizado a diluição seriada antes da transferência para a placa contendo meio Sabouraud.

O plaqueamento das amostras foi realizado em diluições de 1:10 à 1:1000, pelo método de microgota em meio Sabouraud contendo antibiótico (cloranfenicol 0.250g/L). As placas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de 37ºC, e o crescimento monitorado por 48h horas. Finalizado o tempo de incubação, as placas foram retiradas da B.O.D, efetuado a contabilização das colônias e as placas contendo amostras foram autoclavadas e descartadas. O resultado foi calculado de acordo com a diluição e o resultado expresso em gráfico.

4.7 Análise da ativação de neutrófilos por avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mensuração do infiltrado de neutrófilos foi realizada de maneira indireta por meio da quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO). Para realização de MPO, um fragmento de tecido pulmonar é homogeneizado em tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO4; 0,015M NaEDTA) (1 mL/100 mg). Após esse processo, a amostra deve ser centrifugada por 10 minutos à 1008g em temperatura de 4ºC, o sobrenadante desprezado e posteriormente adicionar ao precipitado NaCl 0,2% seguido da adição de NaCl 1,6% com glicose 5% (1 mL/100 mg), sendo que todos os reagentes utilizados nesses processos devem estar em temperatura de 8ºC.

Com o auxílio do vórtex as amostras são homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos à 100g em temperatura de 4ºC e o pellet homogeneizado em tampão Na_3PO4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v (1mL/100 mg) e a seguir congelado e descongelado em nitrogênio líquido por três vezes. Por fim as amostras são centrifugadas mais uma vez, nas mesmas condições, porém por 15 minutos. A atividade da mieloperoxidase é avaliada no sobrenadante pela adição de tetrametilbenzidina e H2O2 e lida em espectrofotômetro em OD de 450nm (Souza, D. et al. 2000).

4.8 Quantificação de quimiocinas por ELISA

A quantificação de CCL2, CCL4, CCL5 foi realizada em amostra de pulmão previamente homogeneizada, através da técnica de ELISA utilizando-se kits R&D Systems, EUA, de acordo com instruções do fabricante.

As amostras de pulmão foram retiradas no momento da eutanásia e armazenadas em freezer em temperatura de -20º até o momento de processamento e análise. O processamento do fragmento pulmonar se inicia com o descongelamento e homogeneização em tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO4; 0,015M NaEDTA) (1 mL/100 mg). Após esse processo, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1008g em temperatura de 4ºC, e o sobrenadante armazenado para realização do teste.

O teste de ELISA tem sua realização em período total de três dias, onde inicialmente a placa de 96 poços é sensibilizada com anticorpo de captura e incubada em câmara úmida *overnight*. No dia seguinte, a placa passou pelo processo de bloqueio com uma solução de PBS suplementada com 1% de albumina bovina, por 2h e sob agitação (Sigma-Aldrich, 25 EUA). Após a incubação, os padrões e as amostras foram adicionados e as placas novamente incubadas *overnight* a 4°C. No terceiro dia, as placas foram lavadas e o anticorpo de detecção adicionado, seguido pelo período de incubação por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionamos a estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingen – 1:4000) e as placas incubadas, nesse momento, por 20 min à temperatura ambiente.

A reação é revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA) e interrompida com a adição de H_2SO_4, a leitura feita em um leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) a 492 nm. Os resultados foram tabelados de acordo com a leitura de concentração e expressos em gráficos.

4.9 Avaliação de função pulmonar por espirometria

A avaliação pulmonar foi avaliada através de espirometria forçada invasiva, no momento da eutanásia (Oliveira, V. *et al*. 2024).

Primeiramente, foi preparado o anestésico na concentração: xilazina 150μL/mL, ketamina 400μL/mL e PBS 1x 450μL/mL, e administrado 5 μL/grama do animal, via intraperitoneal. Os animais são traqueostomizados através de uma pequena incisão, e posicionados no pletismógrafo corporal para conexão a ventilação mecânica, monitorada

através do computador (Forced Pulmonary Maneuver System; Buxco Research Systems, Wilmington, NC, EUA).

Parâmetros como volume corrente (TV), pico de complacência (Cpk), complacência dinâmica (Cdyn), complacência nos primeiros milissegundos (Cp0), complacência do parênquima pulmonar (Cchord) e resistência pulmonar (RL) foram avaliados através da ventilação mecânica e os resultados estabelecidos através do teste de complacência e resistência. A complacência pulmonar reflete a capacidade do pulmão em se distender, o volume corrente determina o quanto de ar está circulando dentro do pulmão e a resistência à facilidade de entrada do ar no pulmão.

Subsequentemente, uma manobra de pressão-volume é realizada para determinar outros parâmetros como capacidade inspiratória (IC), registrado através do volume de fluxo rápido. Para realização desta manobra os pulmões são inflados a >30cm de H2O, de imediato, a máquina realiza uma pressão altamente negativa forçando uma inspiração até <30cm de H2O.

A capacidade vital forçada (FVC) e o volume expiratório forçado (FEV) são determinados durante a manobra final é calculado através do índice de Tiffeneau Pinelli considerando os dois parâmetros (FEV20/FVC).

4.10 Análises estatísticas

Para análise de dados nós utilizamos o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA), onde foram realizadas comparações estatísticas entre os grupos através do teste ANOVA “one way” e pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de $P<0,05$ para análise dessas comparações, sendo o valor de “P” menor que 0,05 considerado diferença estatística. Os resultados foram expressos em gráficos. O ‘N’ amostral foi calculado através do programa *GPower* versão 3.1, de acordo com parâmetros estatísticos de estudos já publicados.

5. RESULTADOS

5.1 Sete ou vinte e um dias após a infecção intranasal com MHV-A59 não há mais recuperação de vírus viável no baço, fígado ou pulmão

Inicialmente, nós avaliamos se com 9 ou 21 dias após infecção por MHV-A59 ainda seria possível recuperar carga viral viável nos baço, fígado e pulmão dos animais. Nossos resultados demonstraram que em ambos os tempos, não foi observada formação de placas de lise em nenhum dos órgãos avaliados, indicando *clearance* viral (dados não mostrados). Tendo em vista esse resultado, esses foram os tempos escolhidos para realizar a infecção com *Candida albicans* (conforme esquematizado na figura 4).

5.2 A infecção prévia pelo MHV-A59 exacerba a lesão pulmonar induzida por *C. albicans*

Nosso próximo passo foi avaliar se a infecção por MHV-A59 interferiria na lesão pulmonar induzida por *C. albicans*. Após 9 dias, animais infectados com MHV-A59 apresentavam discreto aumento de células inflamatórias no pulmão, como demonstrado na figura 7A. Animais infectados apenas com *Candida albicans*, após 2 de infecção, apresentaram um perfil similar de resposta, ou seja, presença de focos inflamatórios dispersos, sem alterações na arquitetura tecidual. Entretanto, nos animais infectados com *Candida albicans,* 7 dias após a infecção com MHV- A59, e eutanasiados com 2 dias de infecção pela levedura (delineamento experimental A, Figura 4A), foi observado a presença de infiltrado inflamatório mais robusto, focos de hemorragia e sinais de morte celular, sugerindo que a infecção com MHV-A59 amplifica os danos no tecido pulmonar induzidos pela infecção com *Candida albicans.* Os resultados de análises quantitativas utilizando escore histopatológico demonstraram o mesmo padrão, o grupo infectado apenas com MHV-A59 ou apenas com *C. albicans* apresentou escore histopatológico moderado com aumento em relação ao grupo não infectado, e grupo submetido a ambas infecções demonstrou escore moderado, com média mais próxima ao intenso (figura 7B). (Figura 7).

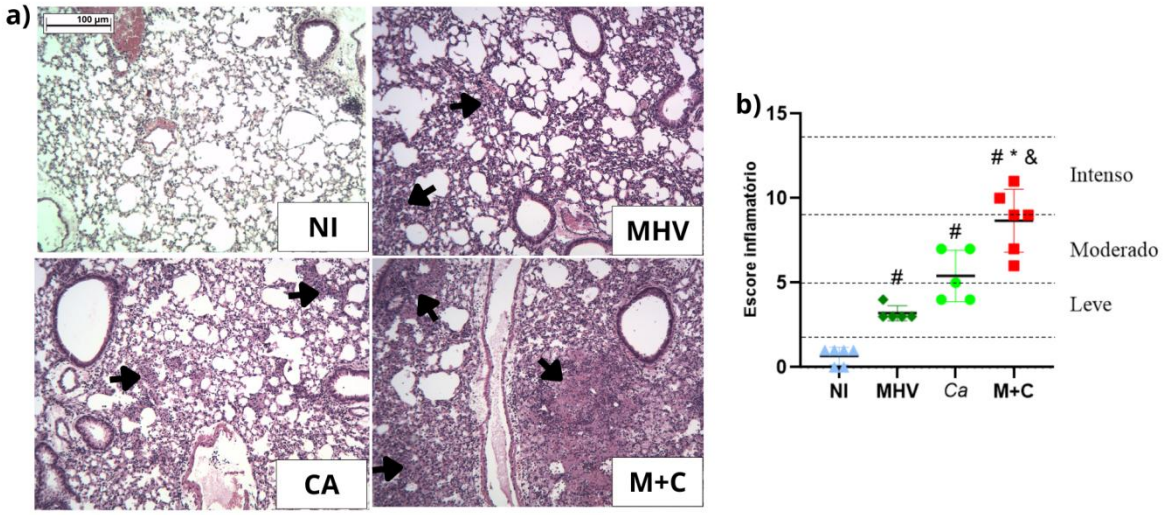

Figura 7. Imagens representativas de alterações histopatológicas de pulmão com escore inflamatório, após 9 dias de infecção por MHV-A59, 2 dpi de *C. albicans* ou ambas as infecções. Amostra representativa de pulmões de camundongos corados com H&E, considerando os grupos: NI (não infectado), *Ca* (infectados com *C. albicans,* 2 dpi*),* MHV (infectados com MHV-A59, 9 dpi) e M+C (infectado com *C. albicans* após 7 dias de infecção com MHV). Registros realizados em microscópio óptico com objetiva em aumento de 10x. A seta destaca a presença de infiltrado inflamatório e sinais de morte celular (a). O gráfico (b) representa análises quantitativas de escore histopatológico, e o teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59 e (&) representa diferença em relação ao grupo controle de *C. albicans*.

Posteriormente, avaliamos a infecção por *Candida albicans* em tempos mais tardios após a infecção por MHV (21 dias, delineamento experimental B, figura 4B). Nossos dados demonstram que após 21 dias de infecção com MHV, os animais demonstraram uma resolução completa dos focos inflamatórios no tecido pulmonar, se apresentando de maneira muito similar ao grupo não infectado. O grupo infectado com *C. albicans* demonstrou poucos focos de inflamação em relação ao tecido saudável do grupo não infectado. De maneira interessante, comparado aos grupos infectados somente com MHV, somente com *C. albicans* ou não infectado, o pulmão de animais do grupo submetido a ambas as infecções demonstraram perda da integridade do tecido, exibindo parâmetros compatíveis com hiperdistensão dos ductos alveolares , como demonstrado na figura 8A. Em análise de escore histopatológico (figura 8B), o grupo infectado apenas com MHV-A59 não demonstrou aumento, enquanto ambos os grupos infectados com *C. albicans* demonstraram aumento em relação ao

grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com MHV. Estes resultados reforçam a restauração do estado inflamatório do grupo infectado apenas com MHV no decorrer do tempo de infecção, e na presença da infecção por *C. albicans* esses parâmetros voltam novamente a ser destacados. Vale ressaltar que apesar de não apresentar parâmetros inflamatórios mais elevados em escore inflamatório, em análises qualitativas como demonstrado na figura 8A, observamos que há perda na integridade do tecido pulmonar no grupo que sofre ambas infecções em relação a todos os grupos utilizados em nossas avaliações.

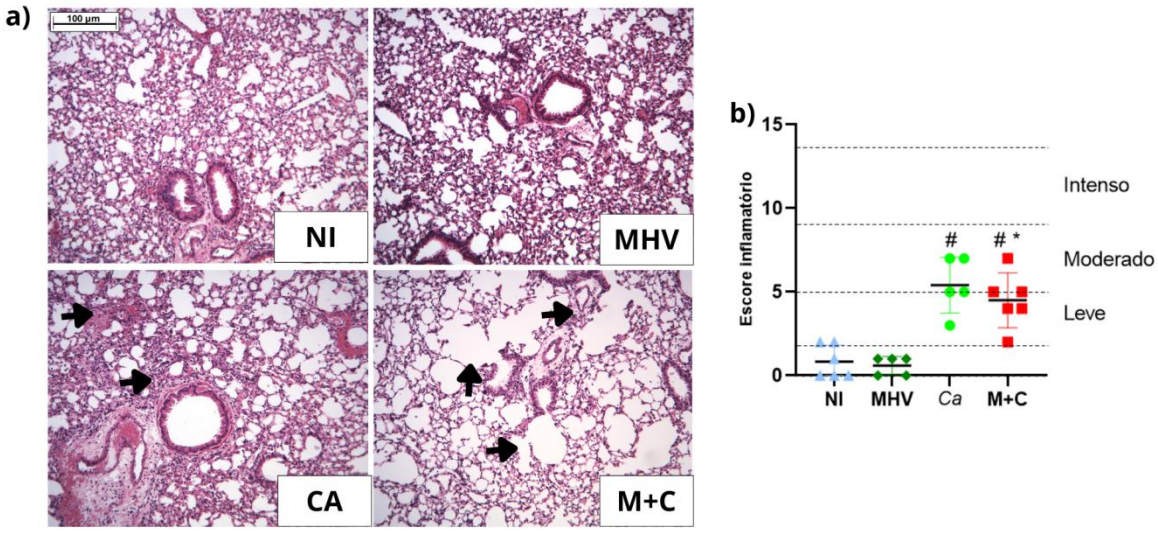

Figura 8. Imagens representativas de alterações histopatológicas de pulmão com escore inflamatório, após 23 dias de MHV-A59, 2 dpi de *C. albicans* ou ambas as infecções. Amostra representativa de pulmões de camundongos corados com H&E, considerando os grupos: NI (não infectado), *Ca* (infectados com *C. albicans,* 2 dpi*),* MHV (infectados com MHV-A59, 9 dpi) e M+C (infectado com *C. albicans* após 7 dias de infecção com MHV). Registros realizados em microscópio óptico com objetiva em aumento de 10x. A seta destaca a presença de infiltrado inflamatório, e no grupo M+C, também indica perda da estrutura pulmonar (a). O gráfico (b) representa análises quantitativas de escore histopatológico, e o teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59 e (&) representa diferença em relação ao grupo controle de *C. albicans*.

5.3 A infecção prévia por MHV-A59 induz alterações na resposta imune adaptativa frente a infecção por *C. albicans*, caracterizado por um aumento nas células TCD8 e diminuição de T reguladoras

Para verificar se o sistema imune adaptativo estava relacionado com a maior lesão pulmonar induzida pelas duas infecções, foi realizada a caracterização do perfil de células TCD4, TCD8 e Treg no pulmão. Em avaliações utilizando o tempo em que a infecção por *C. albicans* foi realizada aos 7 dpi de MHV (delineamento experimental A, figura 4A), não houve diferença entre os grupos avaliados em relação aos linfócitos totais (Figura 9A), bem como em células TCD4 (Figura 9B). Contudo, em análises de células TCD8, o grupo controle de MHV-A59 apresentou diferença em relação ao grupo não infectado, demonstrando aumento do número dessas células no grupo infectado apenas com coronavírus murino. De forma mais expressiva, o grupo submetido a ambas infecções apresentou diferença em relação a todos os grupos utilizados como controle e em relação ao grupo não infectado, indicando uma alta atividade de células T efetoras no hospedeiro frente a ambas infecções (Figura 9C).

Curiosamente, apenas o grupo infectado apenas com *C. albicans* apresentou diferença significativa com aumento no número de células T reguladoras (Treg) em relação a todos os grupos avaliados. Esse achado demonstrou a ineficiência na ativação das células Treg em animais previamente infectados com MHV-A59, visto que o grupo infectado apenas com *C. albicans* exibiu aumento dessas células em relação ao grupo previamente infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (Figura 9D).

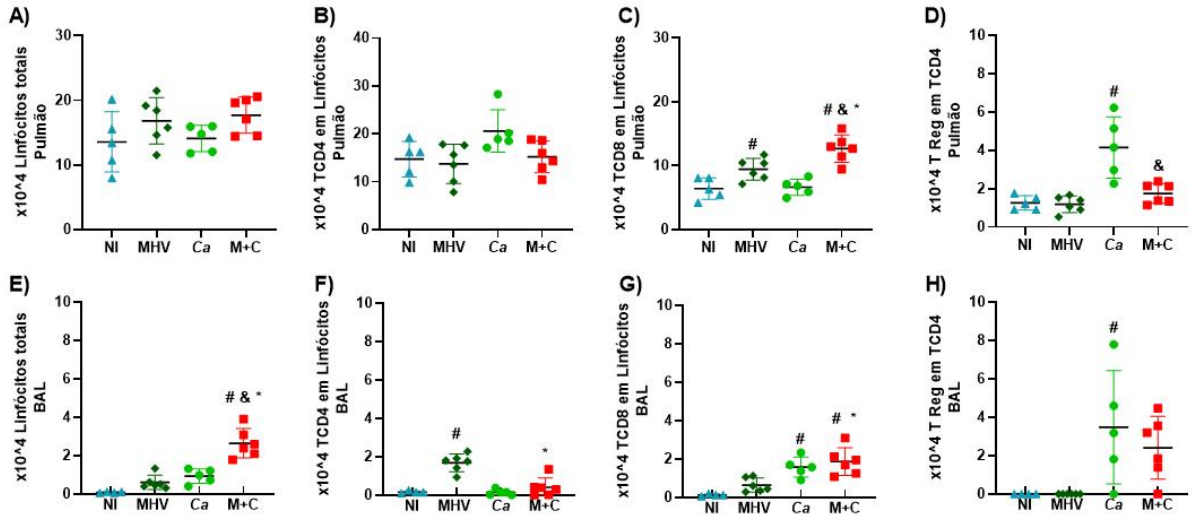

Figura 9. Caracterização de linfócitos em amostras de pulmão e BAL em delineamento experimental de 9 dpi de MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. Grupo não infectado (NI), grupo controle de MHV-A59 (MHV), grupo controle de *C. albicans* (*Ca*) e grupo infectado com MHV-A59 e

posteriormente infectado com *C. albicans* (M+C). Os gráficos de A-D representam amostra de pulmão e E-H amostra de lavado bronco-alveolar (BAL). Os gráficos representam o número de células obtidas através de análise de citometria de fluxo x10^4 considerando o tempo de infecção de 9 DPI de MHV-A59 e 2 DPI de *C. albicans*. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59 e (&) representa diferença em relação ao grupo controle de *C. albicans*. O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa no valor de $P<0.05$.

As análises de linfócitos totais no BAL, diferente do observado em amostra de fragmento pulmonar, demonstram que apenas o grupo submetido à ambas as infecções apresentou diferença estatística, com aumento de linfócitos totais em relação a todos os outros grupos, sugerindo alta atividade de linfócitos no ambiente intra-alveolar (Figura 9E). As células TCD4 foram aumentadas no grupo infectado apenas com MHV em comparação a todos os outros (Figura 9F)

O grupo infectado apenas com MHV não demonstrou diferença na quantidade de células TCD8 no BAL em relação ao grupo não infectado. Entretanto, o grupo infectado apenas com *C. albicans* demonstrou aumento do número células TCD8 em relação ao grupo não infectado. No grupo submetido a ambas as infecções houve aumento do número de células TCD8 em relação ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com MHV, mas não ao grupo infectado apenas com *C. albicans* (Figura 9G). Por fim, as células Treg demonstraram aumento somente no grupo infectado apenas com *C. albicans* (Figura 9H), compatível com achados em análises de pulmão (Figura 10H).

5.4 Alterações no perfil de ativação de linfócitos TCD8 em resposta às células T reguladoras durante infecção tardia por MHV-A59 e posterior infecção por *C. albicans*

A Figura 10A-D representa as análises em tecido pulmonar onde os animais foram infectados com *Candida albicans* 21 dias depois da infecção com MHV (delineamento experimental B, figura 4B). Nesse contexto experimental, apenas os grupos infectados com MHV-A59 apresentaram aumento em quantificação de linfócitos totais em relação ao grupo não infectado (Figura 10A), sugerindo que o vírus induz aumento de linfócitos no pulmão em tempos tardios de infecção. As células TCD4 aumentaram de forma similar em todos os grupos submetidos a infecção, em relação ao grupo controle (Figura 10B). Nossas análises em células TCD8 (Figura 10C) demonstraram aumento no grupo infectado apenas com *C.*

albicans em relação ao grupo não infectado, o mesmo ocorreu no grupo submetido as duas infecções, ou seja, na presença de ambas as infecções, células TCD8 aumentaram em relação ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com MHV. O número de células T reguladoras (Treg) aumentou no grupo infectado apenas com *C. albicans* em comparação aos outros grupos do estudo (Figura 10D), reforçando a hipótese que as células T reguladoras possuem uma baixa ativação após a infecção por coronavírus.

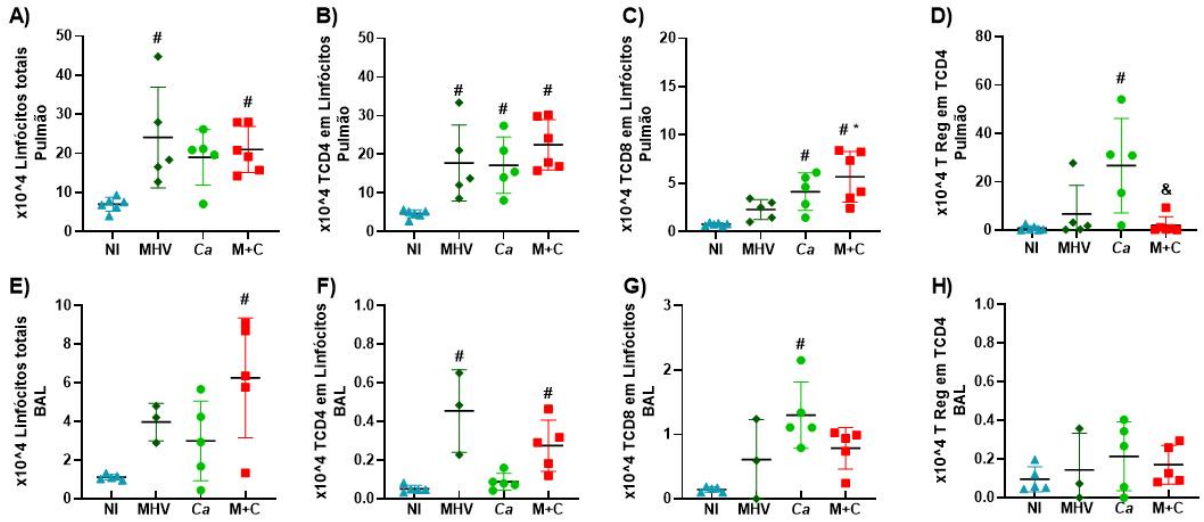

Figura 10. Caracterização de linfócitos em amostra de pulmão e lavado bronco-alveolar em delineamento experimental de 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. Grupo não infectado (NI), grupo controle de MHV-A59 (MHV), grupo controle de *C. albicans* (*Ca*) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (M+C). Os gráficos de A-D representam amostra de pulmão e E-H amostra de lavado bronco-alveolar (BAL). Os gráficos representam o número de células obtidas através de análise de citometria de fluxo x10^4 considerando o tempo de infecção de 23 DPI de MHV-A59 e 2 DPI de *C. albicans*. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59 e (&) representa diferença em relação ao grupo controle de *C. albicans*. O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$.

O BAL de animais infectados com *Candida albicans* 21 dias após a infecção por MHV-A59 apresentou aumento em linfócitos totais em relação ao grupo não infectado, mas não apresentou diferenças em relação aos grupos infectados apenas com MHV-A59 ou com *C. albicans* (Figura 10E). Considerando o número de células TCD4 no BAL, apenas os grupos infectados com MHV-A59 demonstraram aumento em relação ao grupo não infectado, independente da presença da infecção secundária por *C. albicans* (Figura 10F). O número de

células TCD8 em amostras de BAL demonstrou aumento apenas no grupo infectado somente com *C. albicans* em relação ao grupo não infectado (Figura 10G). Em análises de células T reguladoras, contrário ao padrão observado em outras amostras, não foi observado diferença entre os grupos (Figura 10H).

Para sumarizar os dados obtidos através de citometria de fluxo, foi elaborada a tabela 1, onde nas linhas estão dispostos os grupos infectados com seus respectivos tempos e as colunas representam as células e amostras analisadas. As diferenças relatadas na tabela estão relacionadas com o grupo não infectado. Podemos observar uma prevalência de células TCD8 no pulmão do grupo que sofre ambas as infecções, enquanto o aumento de células T reguladoras é encontrado apenas no grupo controle *C. albicans*. Um resultado interessante que podemos destacar é o aumento de linfócitos totais no grupo que sofre ambas as infecções, demonstrando que frente a segunda infecção existe um elevado número dessas células, especialmente no espaço intra-alveolar.

TEMPO AVALIADO	Linfócitos totais (pulmão)	TCD8 (pulmão)	TCD4 (pulmão)	Treg (pulmão)	Linfócitos totais (BAL)	TCD8 (BAL)	TCD4 (BAL)	Treg (BAL)
MHV-A59 9 dpi	ns	↑	ns	ns	ns	ns	↑	ns
C. albicans 2 dpi	ns	ns	ns	↑	ns	↑	ns	↑
MHV-A59 9 dpi + *C. albicans* 2 dpi	ns	↑	ns	ns	↑	↑	ns	ns
MHV-A59 23 dpi	↑	ns	↑	ns	ns	ns	↑	ns
C. albicans 2 dpi	ns	↑	↑	↑	ns	↑	ns	ns
MHV-A59 23 dpi + *C. albicans* 2 dpi	↑	↑	↑	ns	↑	ns	↑	ns

Tabela 1. Sumarização dos dados de avaliação de linfócitos por meio de análise de citometria de fluxo. Os dados apresentados contemplam os dois tempos de infecção utilizados. As 3 primeiras linhas indicam o experimento com o tempo de 9 dpi MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans* e as 3 últimas linhas

indicam os resultados referentes a 23 dpi MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. ns (não significativo); seta para cima (diferença estatística aumentada em relação ao grupo não infectado).

5.5 A infecção prévia por MHV-A59 não altera o *clearance* de *C. albicans*

Uma vez que foi demonstrado que a infecção por *C. albicans* em animais previamente infectados com MHV-A59 aumenta a lesão pulmonar e induz um aumento de células T efetoras, nossa próxima etapa foi verificar se essa lesão estava associada a um prejuízo no *clearance* de *C. albicans*. Em amostra de pulmão e BAL foi identificado crescimento fúngico semelhante entre os grupos infectados com *C. albicans*, tanto o infectado apenas com *C. albicans* quanto o grupo que sofre ambas as infecções como representado na Figura 11, demonstrando dessa maneira que o crescimento fúngico não é influenciado pela infecção prévia com o vírus. Em amostras de fígado e rim não foi observado crescimento fúngico, indicando que não houve translocação fúngica para outros órgãos em nenhum grupo avaliado.

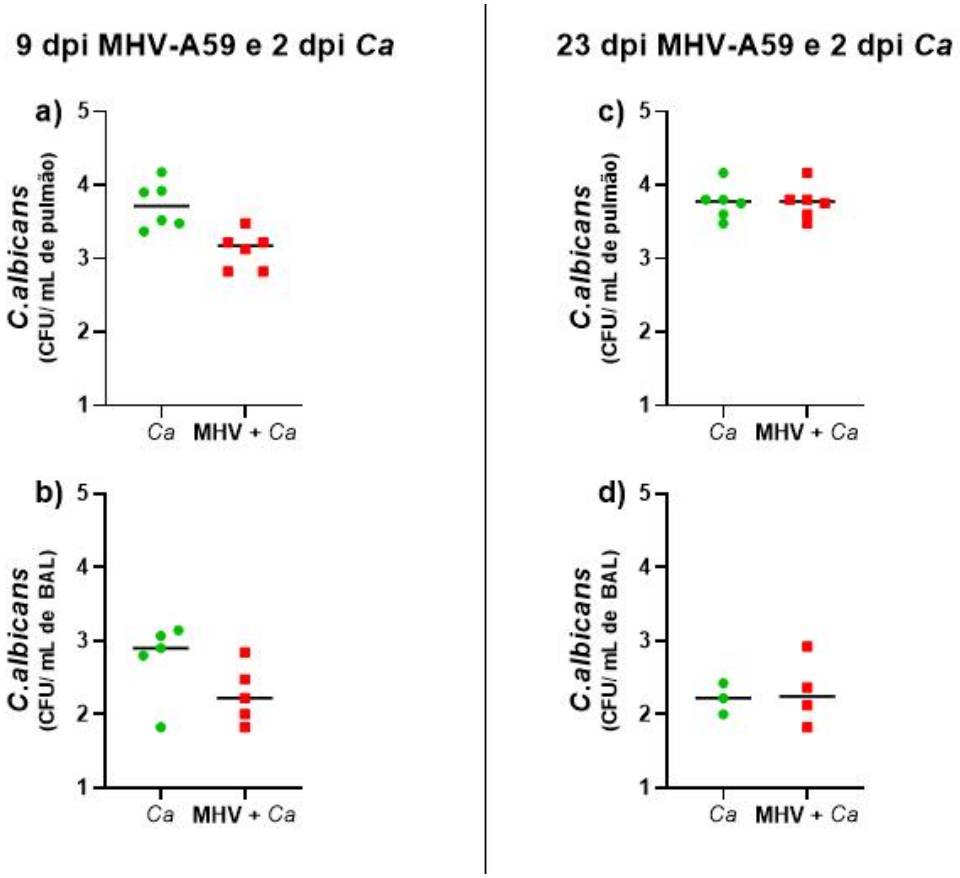

Figura 11. Quantificação de *C. albicans* utilizando 9 e 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*. Grupo controle de *C. albicans* (*Ca*) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (MHV+*Ca*). Os gráficos A-B demonstram o tempo de 9 dpi de MHV-A59 + 2 dpi *C. albicans* e os gráficos C-D representam o tempo de 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi *C. albicans*. Os

gráficos A e C representam a quantificação em amostra de pulmão e os gráficos B e D a quantificação em lavado broncoalveolar. O teste utilizado para essas análises foi o Mann-Whitney através do programa GraphPrism considerando diferença significativa o valor de P<0.05.

5.6 A infecção por *C. albicans* induz aumento na atividade de neutrófilos

O grupo infectado com *C. albicans* apresentou aumento da atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão quando comparado ao grupo não infectado. De maneira interessante, no grupo submetido a infecção pelos dois patógenos o aumento da atividade de MPO é semelhante ao que ocorre apenas no grupo infectado com *C. albicans*. No grupo infectado com MHV não há aumento da atividade de MPO (figura 12A-B). Vale ressaltar que a atividade de MPO foi similar nos dois tempos avaliados, comprovando que aumento da atividade de neutrófilo está associado a infecção por *C. albicans* e não pela infecção por MHV.

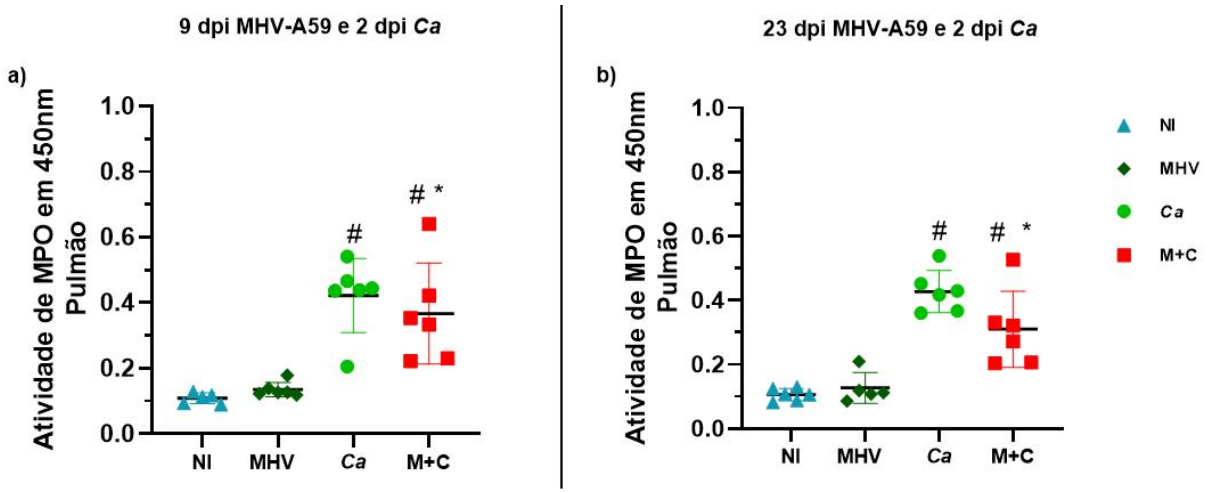

Figura 12. Avaliação da enzima mieloperoxidase em pulmão. Grupo não infectado (NI), grupo controle de MHV-A59 (MHV), grupo controle de C. albicans (Ca) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com C. albicans (M+C). Os gráficos representam a atividade da enzima mieloperoxidase em amostra de pulmão, na leitura de 450nm de absorbância em espectofotometro. O gráfico (A) demonstra o tempo de 9 dias após infecção com MHV-A59 e 2 dias após infecção com C. albicans,e o gráfico (B) representa o tempo de 23 dias após infecção com MHV-A59 e 2 dias após infecção com C. albicans. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59. O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de P<0.05.

Considerando o tempo indicado no delineamento experimental A (Figura 4A), a concentração de CCL2 (Figura 13A) aumentou no grupo infectado somente com *C. albicans* em comparação ao grupo não infectado. No grupo que sofreu ambas as infecções o aumento de CCL2 ocorreu em comparação aos grupo não infectado e infectado apenas com MHV-A59 e, entretanto, houve uma redução em relação ao grupo infectado somente com *C. albicans*. De maneira interessante, a concentração de CCL4 aumentou no grupo infectado apenas com *C. albicans* em comparação ao grupo não infectado. De forma interessante, no grupo infectado com *C. albicans* 7 dias após a infecção com MHV-A59 houve redução da concentração de CCL4 em comparação ao grupo apenas infectado com *C. albicans*. O grupo infectado apenas com MHV-A59 demonstrou uma redução de CCL4 em relação ao grupo não infectado (Figura 13B).

Como podemos observar na figura 13C, a concentração de CCL5 reduziu nos grupos infectados apenas com MHV-A59 ou *C. albicans* quando comparado ao grupo não infectado. Entretanto, a concentração de CCL5 no grupo que sofreu ambas as infecções não foi reduzida em relação ao grupo não infectado.

A infecção com *Candida albicans* 21 dias após a infecção com MHV-A59 (delineamento experimental B, figura 4B) não induziu alteração na concentração de nenhuma das quimiocinas avaliadas (Figura 13D-F).

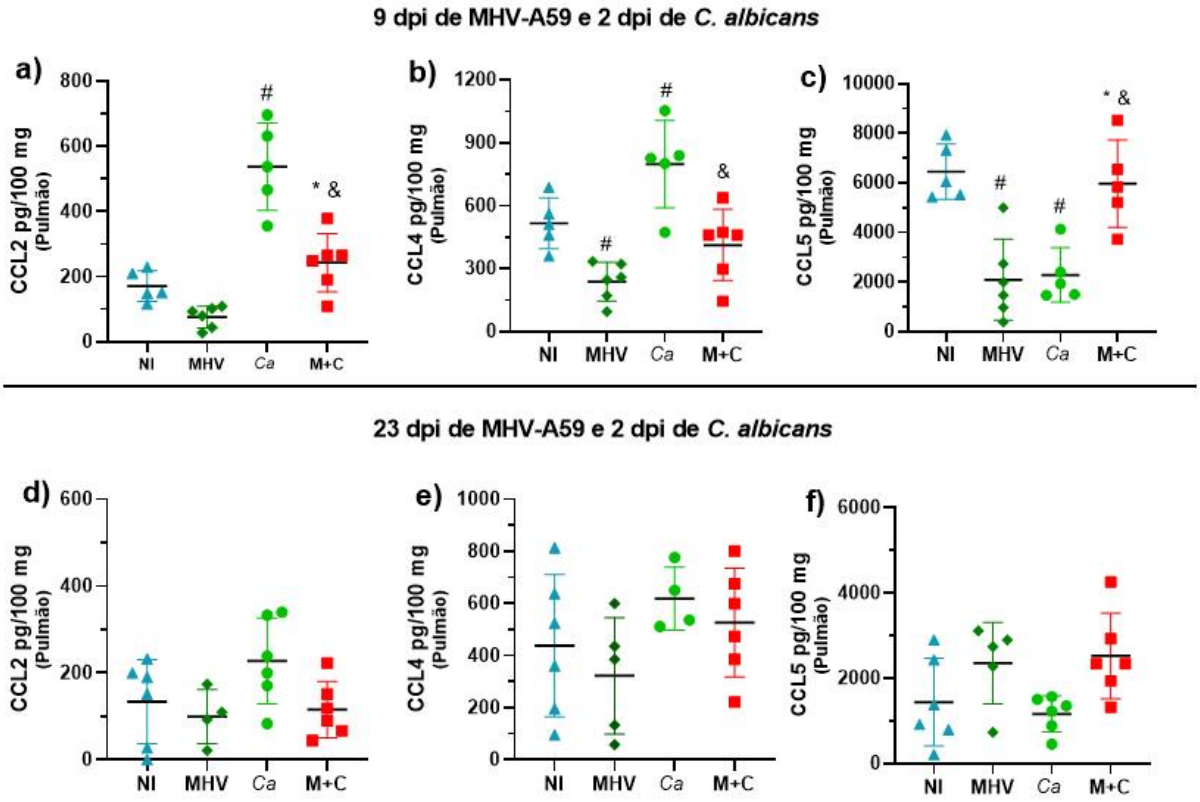

Figura 13. Quantificação de quimiocinas no pulmão de animais infectados com MHV-A59 e *C. albicans*. Os gráficos representados de (A-C) expressam resultados obtidos em análise de experimento utilizando 9 dpi de MHV e 2 dpi de *C. albicans*, e os gráficos (D-F) expressam os resultados obtidos em análise de experimento utilizando 23 dpi de MHV e 2 dpi de *C. albicans*. Grupo não infectado (NI), grupo controle de MHV-A59 (MHV), grupo controle de *C. albicans* (*Ca*) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (M+C). O.D.: Densidade óptica. (#) representa a diferença do grupo em relação ao grupo não infectado, (*) representa a diferença do grupo em relação ao grupo controle de MHV-A59 e (&) representa diferença em relação ao grupo controle de *C. albicans*. O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$.

5.7 A infecção por MHV-A59 induz alterações na função pulmonar, que persistem após a infecção por *C. albicans*, em tempos mais longos de infecção

Para avaliação da função pulmonar a infecção por *C. albicans* foi realizada aos 21 dpi de MHV-A59 e as avaliações realizadas após 2 e 9 dpi de *C. albicans* (figura 5:delineamento experimental de mecânica pulmonar). Não foi observado diferença entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados, considerando 23 dpi de MHV e 2 dpi de *C. albicans* (Figura 14). Demonstrando com esse conjunto de dados, que após 2 dpi de *C. albicans* não induziu comprometimento da função pulmonar.

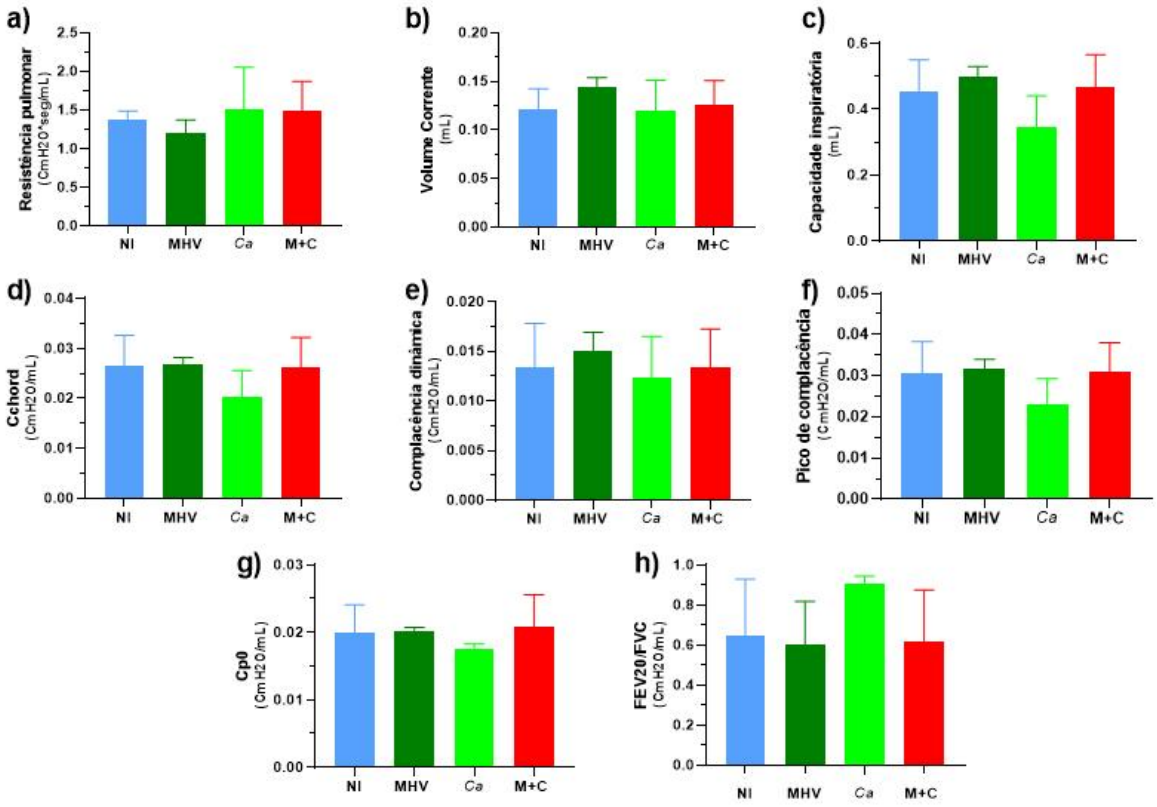

Figura 14. Avaliação da função pulmonar em 23 dpi de MHV-A59 e 2 dpi de *C. albicans*. Grupo não infectado (azul), grupo controle de MHV-A59 (verde escuro), grupo controle de *C. albicans* (verde claro) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (vermelho). Resistência pulmonar (a). volume corrente (b), capacidade inspiratória (c), Cchord que compreende a complacência do parênquima pulmonar (d), complacência dinâmica (e), pico de complacência (f), Cp0 que representa a complacência nos primeiros milissegundos (g) e FEV2/FVC que compreende o volume expiratório forçado pela capacidade vital forçada (h). O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$.

Em contraste com os dados encontrados em avaliação de 23 dpi de MHV e 2 dpi de *C. albicans*, os dados obtidos em análises realizadas em 30 dias de infecção por MHV e 9 dias de infecção por *C. albicans* (figura 5: delineamento experimental de mecânica pulmonar) demonstraram alterações na função pulmonar (figura 15). Em avaliação da resistência pulmonar, foi identificado redução na resistência considerando o grupo infectado apenas com *C. albicans* e o grupo não infectado, bem como o grupo que sofreu ambas as infecções também apresentou redução na resistência pulmonar em relação ao grupo não infectado e ao

grupo infectado apenas com MHV (Figura 15A), demonstrando uma baixa resistência à entrada de ar no pulmão relacionado a infecção por *C. albicans*.

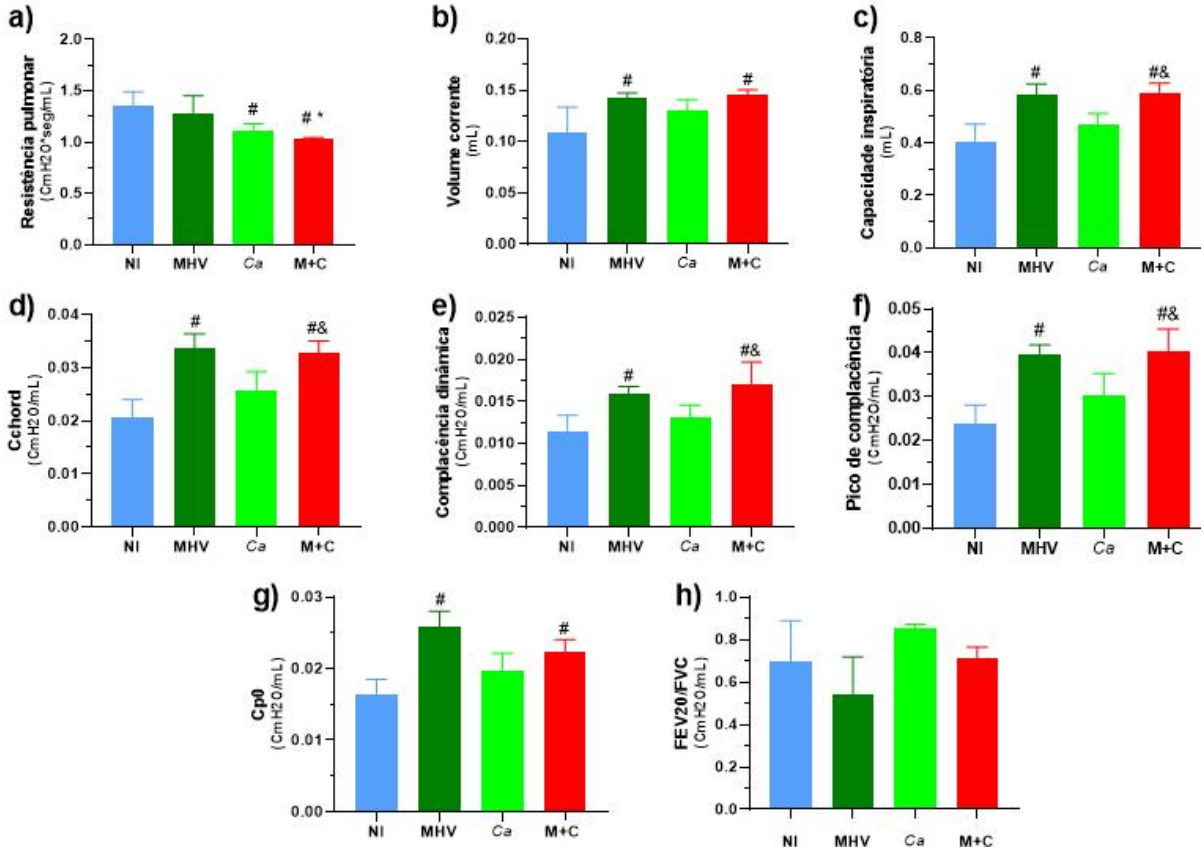

Figura 15. Avaliação da função pulmonar em 30 dpi de MHV-A59 e 9 dpi de *C. albicans*. Grupo não infectado (azul), grupo controle de MHV-A59 (verde escuro), grupo controle de *C. albicans* (verde claro) e grupo infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* (vermelho). Resistência pulmonar (a). volume corrente (b), capacidade inspiratória (c), Cchord que compreende a complacência do parênquima pulmonar (d), complacência dinâmica (e), pico de complacência (f), Cp0 que representa a complacência nos primeiros milissegundos (g) e FEV2/FVC que compreende o volume expiratório forçado pela capacidade vital forçada (h). O teste utilizado para análises foi o ANOVA-ONE WAY através do programa GraphPrism considerando diferença significativa valor de $P<0.05$.

Curiosamente, neste parâmetro, que infere o volume corrente de ar no ambiente pulmonar, o grupo infectado apenas com *C. albicans* não demonstrou aumento em relação ao grupo não infectado, diferente do observado para o grupo infectado apenas com MHV-A59 que demonstrou aumento em relação ao grupo não infectado (Figura 15B). Também foi observado aumento no grupo submetidos a ambas as infecções em relação ao grupo não infectado, o que era esperado dado a baixa resistência pulmonar descrita no parâmetro anterior. Considerando a capacidade inspiratória, resultado semelhante ao volume corrente de

ar foi observando, onde o grupo infectado apenas com MHV-A59 demonstrou aumento em relação ao grupo não infectado, e o grupo previamente infectado com MHV-A59 e posteriormente infectado com *C. albicans* apresentou aumento frente ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas por *C. albicans* (Figura 15C). Neste momento, podemos correlacionar as diferenças observadas em aumento da capacidade inspiratória e aumento do volume de ar a infecção por MHV-A59.

Quanto às análises considerando a complacência pulmonar, ambos os grupos infectados com o vírus demonstraram um importante aumento em relação ao grupo não infectado. Ao avaliarmos a complacência estática (Cchord), podemos observar que ambos os grupos infectados com MHV-A59, independente da segunda infecção, apresentaram aumento significativo da distensão do parênquima pulmonar em relação ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com *C. albicans* (Figura 15D).

Relacionado a complacência dinâmica (Cdyn), que compreende a capacidade de distensão do parênquima pulmonar e da caixa torácica, resultados semelhantes foram observados, onde ambos os grupos infectados com coronavírus murino demonstraram aumento significativo frente ao grupo não infectado, independente da segunda infecção (Figura 15E). Outras duas avaliações também relacionadas a complacência, apresentaram alterações interessantes, onde no pico de complacência o grupo infectado apenas com MHV apresentou diferença em relação ao grupo não infectado e o grupo submetido a ambas as infecções também demonstrou esse mesmo aumento, acrescido de também exibir aumento frente ao grupo infectado apenas com *C. albicans* (Figura 15F). A complacência nos primeiros milissegundos (Cp0) apresentou diferença semelhante ao observado em outros parâmetros de complacência (Figura 15G), onde ambos os grupos que foram infectados por MHV demonstraram aumento em relação ao grupo não infectado.

Através da análise envolvendo volume expiratório e capacidade vital, é possível expressar se o volume de ar que é inspirado pelo animal é igualmente expirado, certificando se o ar permanece preso dentro do pulmão ou liberado de maneira fisiologicamente correta. De forma inesperada, não foi observado diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dois tempos empregados em nossas análises (Figura 15H), visto que associado aos outros parâmetros, o volume expiratório deveria ter uma propensão a ser reduzido nos grupos infectados com MHV em tempos tardios.

A tabela 2 apresentada a seguir expressa uma sumarização dos dados obtidos através da avaliação de função pulmonar, contendo todos os parâmetros avaliados e quais os grupos apresentaram aumento ou redução significativa em relação ao grupo não infectado. Para leitura da tabela, considerar nas linhas horizontais os tempos e grupos avaliados e nas colunas os parâmetros estudados. Como podemos observar, de maneira resumida, o tempo tardio de MHV-A59 (30 dpi) associado ao tempo tardio de *C. albicans* (9 dpi) promoveu comprometimento da função pulmonar, com parâmetros semelhantes ao observado em doença pulmonar obstrutiva, todavia, sem alteração no volume expiratório. Demonstrando um padrão misto de doença pulmonar.

TEMPO AVALIADO	RL	TV	IC	CPK	CP0	CCHORD	CDYN	FEV20/FVC
MHV-A59 23 dpi	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C. albicans 2 dpi	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MHV-A59 23 dpi + *C. albicans* 2 dpi	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MHV-A59 30 dpi	ns	↑	↑	↑	↑	↑	↑	ns
C. albicans 9 dpi	↓	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MHV-A59 30 dpi + *C. albicans* 9 dpi	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	ns

Tabela 2. Sumarização de dados obtidos em avaliação de função pulmonar. RL=Resistência pulmonar; TV=Volume corrente; IC=Capacidade inspiratória; CPK=Pico de complacência; CP0=Complacência nos primeiros milissegundos; CCHORD=Complacência do parênquima pulmonar; CDYN=Complacência dinâmica; FEV20/FVC=Volume expiratório forçado/Capacidade vital forçada. Ns (não significativo); seta para cima (diferença estatística aumentada em relação ao grupo não infectado); seta para baixo (diferença estatística reduzida em relação ao grupo não infectado)

6. DISCUSSÃO

A COVID longa revelou-se a partir da observação que pacientes que tiveram COVID aguda, podem posteriormente exibir sintomas e outras complicações mesmo após não apresentar mais vírus detectável, sendo esses sintomas considerados sequelas da infecção por SARS-CoV-2 (Hastie, C. et al. 2023). Em nossas condições experimentais não foi detectado a presença de coronavírus murino após 9 dias de infecção, embora tenha sido identificado alterações pulmonares nos diferentes tempos avaliados, demonstrando que o modelo experimental utilizado na presente pesquisa remete a dados da COVID longa encontrados na clínica, em que há uma condição que emerge como uma consequência posterior a fase aguda da doença, estando assim o hospedeiro recuperado da carga viral, todavia, com manifestações clínicas persistentes.

Já foi demonstrado na COVID aguda que a *Candida albicans* é um microrganismo oportunista que está amplamente relacionado em situações de co-infecção, bem como está relacionado a uma resposta inflamatória excessiva, com aumento de anticorpos específicos para essa levedura, associados à patogênese da doença (Lagree, K.; Chen, P. 2023). Kusakabe, *et al*. destacaram que a alteração de microbiota associada a COVID-19 correlaciona com um aumento de *C. albicans* no intestino, contribuindo diretamente com a gravidade da doença. Esse estudo também demonstrou um aumento significativo de neutrófilos em pacientes com ambas infecções, sugerindo que aumento de marcadores inflamatórios induzidos por *C. albicans* contribuem para a imunopatologia da doença aguda grave, bem como na COVID longa (Kusakabe, *et al*. 2023). Assim como o observado em parâmetros intestinais, estudo realizado com paciente cuja causa inicial de internação foi COVID-19, relatou agravamento do quadro clínico com cultura positiva para *Candida spp*. em amostras de aspirado brônquico, além de achados radiológicos e aumento na contagem de leucócitos (Bórtoli, R. et al. 2021; Delisle, Marie-Soleil et al. 2008).

Em nosso contexto experimental, era esperado que observássemos um aumento na recuperação fúngica do grupo submetido a ambas as infecções em relação ao grupo infectado apenas com *C. albicans*, como demonstrado em por Kusakabe et al, todavia, não houve diferença entre os grupos. De maneira interessante, apesar de não alterar a carga fúngica recuperada, obtivemos resultados compatíveis com exacerbação da inflamação e presença de lesão pulmonar. Esses resultados indicam que a infecção por coronavírus por si só não induz a um ambiente mais propício para o crescimento fúngico, sugerindo que a interação entre a

infecção viral inicial e a infecção secundária por fungo pode ser influenciada por outros fatores. Além disso, os nossos resultados favorecem a evidência que a infecção pulmonar por *C. albicans* foi efetiva, embora não tenha induzido diferença no crescimento entre os grupos.

A mudança que ocorre nos alvéolos na COVID-19 devido a presença de infiltrado inflamatório, já foi bem descrita em outros estudos. Andrade e colaboradores demonstraram em seu estudo realizado com betacoronavírus murino, alterações histopatológicas com presença de infiltrado inflamatório que se estende por todo tecido pulmonar em 3 dpi de infecção, sendo que quando avaliado em 5 dpi foi menos expressivo, exibindo redução inflamatória quando a carga viral se encontra reduzida. Essas alterações também foram caracterizadas em avaliação de hospedeiro humano infectado pelo vírus SARS-CoV-2 em outros estudos, como demonstrado por Zarrilli, G. e colaboradores, alterações histopatológicas com presença de infiltrado inflamatório robusto no pulmão de pacientes infectados (Andrade, A. *et al*. 2021; Zarrilli, G. *et al*. 2021).

Em acordo com esses achados, em nossas análises histopatológicas identificamos no grupo que foi submetido a ambas as infecções presença robusta de infiltrado inflamatório, especialmente em amostras coletadas utilizando o tempo no qual a infecção por *C. albicans foi* induzida após 7 dias de MHV-A59. Entre os achados histopatológicos, foi identificado presença de morte celular e focos hemorrágicos. Essa presença robusta de infiltrado inflamatório consiste em uma resposta imunológica intensa, que pode levar ao comprometimento da integridade dos alvéolos pulmonares. A partir disso, podemos então sugerir que esses resultados demonstram uma resposta imunológica potencializada frente a infecção secundária por *C. albicans*, podendo ter como consequência lesões pulmonares e comprometimento da função fisiológica do pulmão.

Curiosamente, em tempos mais tardios onde a infecção por *C. albicans* foi realizada após 21 dias de infecção por MHV-A59, as mesmas análises histopatológicas revelaram uma modificação característica no tecido pulmonar, onde apesar do escore inflamatório ter se apresentado entre leve e moderado, observamos sinais evidentes de hiperdistensão dos alvéolos pulmonares, podendo estar relacionado com um comprometimento dos septos alvéolares. Esses resultados sugerem que a presença do coronavírus de maneira inicial, leva a uma fragilidade do tecido, que foi associada a ação da resposta inflamatória.

Voiriot, G. e colaboradores realizaram um estudo com pacientes em período pandêmico da COVID-19, demonstrando alta concentração de neutrófilos em BAL de

pacientes com prognóstico ruim (Voiriot, G. *et al*. 2022). Por outro lado, Arifa et al 2023 associaram a neutrofilia em pacientes idosos com maior gravidade e mortalidade da doença (Arifa, R. *et a*l. 2023). Considerando a relevância dessa célula no cenário da COVID-19, quantificamos a concentração da enzima mieloperoxidase (MPO) a fim de avaliar atividade de neutrófilos, como resultado, observamos um aumento na atividade de neutrófilos apenas nos grupos infectados com *C. albicans,* associando o aumento em neutrófilos a infecção pelo fungo, sem interferência evidente da infecção pelo vírus. Esses resultados demonstram que em nossas condições experimentais, a *C. albicans* induz uma ação direta da resposta imune inata, e a resposta imune adaptativa poderia desempenhar um importante papel inerente ao MHV-A59.

O aumento considerável de células imunes efetoras na COVID-19, embora ainda não completamente compreendido, é apontado como fator importante para o desenvolvimento da CL. A hiperinflamação tanto de maneira localizada quanto sistêmica, com aumento de células e mediadores inflamatórios, tem sido identificada como um desencadeador chave para o processo de desenvolvimento de novos sintomas, bem como a manutenção dos sintomas presentes no momento da infecção aguda (Vijayakumar, B. *et al*. 2022). Esses fatores estão diretamente relacionados aos resultados obtidos em nosso estudo, onde na presença de um segundo estímulo infeccioso, identificamos uma resposta imunológica com predominância de células T efetoras, sem regulação adequada por parte das células T reguladoras, o que ser considerado um fator importante na patogênese da CL.

Os linfócitos TCD8, também conhecidos como T citotóxicos, desempenham um papel crucial na eliminação de patógenos, na COVID longa o seu papel ainda está sendo elucidado. Em nossa pesquisa, demonstramos que a infecção por MHV-A59 induz um aumento das células TCD8 no pulmão (Tabela 1), que é exacerbada na presença de uma segunda infecção por *C. albicans*. Esses dados são interessantes pois demonstram que nossas observações histopatológicas de pulmão, onde identificamos um aumento no escore inflamatório dos animais submetidos a ambas as infecções, podem estar mais diretamente associadas à resposta celular e não ao aumento da carga fúngica no órgão.

Apesar da importante função da célula TCD8 frente a infecções, sem uma regulação adequada, pode levar a uma inflamação persistente tendo como consequência uma destruição de células do tecido, impedindo a restauração da homeostase do organismo e restabelecimento do equilíbrio imunológico (Villaseñor-Altamirano, A. *et al*. 2023). Em acordo com esses

estudos, apesar de não haver mais presença do vírus e nem lesão tecidual robusta, a *C. albicans* é inserida em um ambiente com alterações celulares importantes, sugerindo que o aumento de células TCD8 pode estar associado a maior lesão pulmonar após a infecção por *C. albicans*, tanto em um momento mais precoce de infecção quanto em um contexto mais tardio.

Esses achados também foram identificados em outros contextos clínicos, como em pacientes com DPOC, onde a ação persistente das células TCD8 tem sido associada a manutenção da resposta inflamatória (Hogg, J.; Macklem, P.; Thurlbeck, W.; 1968). Essa ocorrência reflete uma ativação imunológica constante por parte dos linfócitos TCD8, que, de maneira análoga ao observado em nosso estudo, pode favorecer ao dano no tecido pulmonar.

Um aspecto importante que observamos foi o fato das células T reguladoras não apresentarem aumento após a infecção por *C. albicans* no grupo submetido a ambas as infecções, como observado no grupo infectado apenas por *C. albicans*. As células Treg desempenham um papel fundamental no contexto inflamatório, visto que atuam através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, regulando assim o processo inflamatório e garantindo a homeostase do organismo (Lao, P. et al. 2023). Já foi evidenciado anteriormente que as células Treg são importantes para supressão de células TCD8, sendo esse efeito importante em diversos contextos patológicos (Kondelková, K. et al. 2010). O equilíbrio entre o processo pró-inflamatório e anti-inflamatório garante a manutenção da integridade do tecido atingido, quando essa imunomodulação é inibida, pode resultar em uma resposta imunológica exacerbada com consequências como o observado em nosso estudo, onde na ausência das células Treg, houve um aumento de células TCD8 resultando em lesão ao tecido pulmonar.

Em razão desse quadro, onde são observados danos pulmonares significativos, a função pulmonar pode ser impactada, evidenciando que a interação entre essas infecções pode levar a impactos graves e duradouros para a saúde pulmonar. As alterações em análises histopatológicas observadas em estágios tardios de nossas análises, associadas a hiperdistensão dos alvéolos e possível ruptura dos septos alveolares, juntamente com o aumento das células TCD8, apresentam semelhanças notáveis com o observado em doenças como a DPOC. A inflamação persistente na DPOC, bem como os danos estruturais ao tecido pulmonar, estão frequentemente associados à progressão da doença e comprometimento da função respiratória (Petta, A., 2014).

O comprometimento da função pulmonar é uma consequência de diversos fatores, como doenças pré-existentes, infecções virais e exposições ambientais, se tornando uma importante ferramenta para avaliar alteração ou perda de função do órgão frente à infecção. Com base nos resultados obtidos inicialmente, onde avaliamos parâmetros inflamatórios, microbiológicos e histopatológicos, direcionamos nossa análise para avaliação de função pulmonar, objetivando compreender se as alterações observadas são refletidas na função respiratória dos animais. Para esse experimento optamos por seguir com o tempo mais tardio de infecção, devido aos achados histopatológicos de pulmão. Contrário ao que esperávamos, considerando o tempo de 23 dias de infecção por MHV-A59 e dois dias de infecção por *C. albicans*, não observamos diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados. No entanto, as análises histopatológicas considerando este mesmo tempo, apresentaram alterações consistentes com o observado em pacientes com comprometimento da função pulmonar.

De maneira interessante, ao considerar um tempo mais longo de ambas as infecções onde trabalhamos com o tempo de 30 dias após infecção por MHV-A59 e 9 dias após infecção por *C. albicans*, diversos parâmetros apresentaram diferenças significativas no grupo que sofre ambas infecções frente ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com *C. albicans*, sugerindo a influência do tempo de infecção na modulação da resposta imunológica e comprometimento da função respiratória dos animais. O comprometimento da função pulmonar após infecção por SARS-CoV-2 já foi demonstrado, em que pacientes apresentaram alterações compatíveis tanto com doença pulmonar restritiva quanto doença obstrutiva (Torres-Castro, R. et al. 2021). Um estudo realizado com pacientes 3 meses após hospitalização por COVID-19 demonstrou comprometimento da função pulmonar, com redução da capacidade de transferência de monóxido de carbono (DLCO), que resulta diretamente na dispneia e falta de ar pós esforço frequentemente relatada em pacientes acometidos pela COVID-19 que persistem na COVID longa (Núñez-Fernández, M. et al. 2021).

Dentro de nossas condições experimentais, foi identificado uma diminuição da resistência pulmonar em ambos os grupos infectados por *C. albicans* em relação ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas com MHV-A59, como demonstrado na tabela 2. Esses resultados indicam uma entrada de ar além do considerado adequado fisiologicamente, sem resistência a essa entrada por parte do pulmão. De modo interessante, ao avaliarmos outros parâmetros como capacidade inspiratória e volume corrente, o aumento foi atribuído a ambos

os grupos que foram infectados com MHV-A59 em relação ao grupo não infectado e o infectado apenas com *C. albicans*, sendo esses parâmetros também associados ao aumento do fluxo de ar no pulmão além do adequado em hospedeiro saudável. Esse grupo de resultados indicam alterações importantes no contexto pós-infeccioso, pois demonstram a ineficiência do órgão em administrar a entrada de ar para o ambiente pulmonar após ser submetido a infecção.

Em concordância com esses resultados, observamos em parâmetros relacionados a complacência pulmonar um comportamento semelhante ao identificado para volume corrente e capacidade inspiratória, com aumento em todos os parâmetros avaliados de complacência atribuído à ambos os grupos infectados com MHV-A59 em relação ao grupo não infectado e ao grupo infectado apenas por *C. albicans*, associando essas alterações a ação direta do vírus, sem interferência da ação do fungo nesse contexto. A complacência pulmonar compreende a capacidade do pulmão em se expandir, quando aumentada, indica que o pulmão está se expandindo com uma pequena variação de pressão, podendo ser um indicativo de de degradação do tecido pulmonar, sendo este resultado compatível com nossas análises histopatológicas de pulmão.

O conjunto de resultados obtidos em avaliação de função pulmonar demonstram que a infecção por *C. albicans* induz a uma baixa resistência no tecido pulmonar, enquanto a infecção por coronavírus murino atua ampliando a capacidade inspiratória e volume corrente de fluxo de ar nos pulmões, além do que seria adequado considerando o ponto de vista fisiológico. Esse aumento no fluxo de ar nos pulmões associado ao aumento na complacência pulmonar, podem indicar perda da integridade dos septos alveolares, com hiperdistensão dos alvéolos, características que observamos em nossas análises de histopatologia. Esse padrão de alterações condiz com a condição de doença pulmonar obstrutiva, onde o fluxo de ar que entra nos pulmões é maior do que o observado em uma pessoa saudável, com uma retenção do ar no espaço alveolar. Alterações em padrões respiratórios também foram observados em pacientes que desenvolveram COVID longa, como relacionado por Archambault e colaboradores, destacando entre a diversidade de sintomas relatados, alterações respiratórias (Archambault, P. et al. 2024).

Tendo o exposto acima, nós observamos aumento em todos os parâmetros de complacência pulmonar, no grupo submetido a ambas infecções considerando o tempo tardio de ambas infecções, MHV-A59 (30 dpi) e de *C. albicans* (9dpi), o que condiz com os

resultados observados para resistência pulmonar, capacidade inspiratória e volume corrente. Curiosamente, outro parâmetro importante para determinação de doença pulmonar obstrutiva, que confere o volume expiratório forçado (FEV) em relação à capacidade vital forçada (FVC), não demonstrou diferença estatística entre os grupos avaliados. Esse resultado foi contrário ao identificado para doença obstrutiva, pois na doença obstrutiva o volume expiratório do indivíduo acometido é reduzido, resultando na retenção do ar no ambiente pulmonar, e em nossas avaliações, todos os nossos grupos apresentaram normalidade no volume de ar expirado. Sendo assim, observando os resultados relacionados à função pulmonar como um todo, trouxe para nossa avaliação a ideia de uma doença clinicamente similar a enfisema pulmonar, porém, não contemplando todas as alterações respiratórias observadas nessa doença.

Embasado nos resultados obtidos, sugerimos que o aumento de células TCD8 e incapacidade de aumento de célula T reguladoras induzido por MHV-A59, desempenham um papel fundamental na suscetibilidade dos indivíduos a agravamento do quadro clínico frente a uma infecção posterior com *C. albicans*. Essa hipótese é sustentada pela evidência de aumento nas células T efetoras, como células TCD8, sem regulação adequada por parte das células T reguladoras, perpetuando o processo inflamatório e resultando em lesão pulmonar com comprometimento da função pulmonar.

7. CONCLUSÃO

A ativação persistente de células T efetoras e ineficiência da modulação de células T reguladoras, levou a um impacto direto ao tecido afetado pela infecção, como observado em nossas análises histopatológicas de pulmão. Como consequência, o órgão não apenas falhou em restaurar sua homeostase, como apresentou alterações celulares importantes, resultando em comprometimento da função pulmonar. Esse mecanismo pode explicar a gravidade do quadro clínico de pacientes expostos à infecção por SARS-CoV-2 e posteriormente à *Candida albicans*, destacando a importância de estratégias de prevenção que visem restaurar o equilíbrio da resposta imunológica, promovendo a resolução efetiva da inflamação.

8. REFERÊNCIAS

ABDOLI, Amir; FALAHI, Shahab; KENARKOOHI, Azra. COVID-19-associated opportunistic infections: a snapshot on the current reports. **Clinical and experimental medicine**, v. 22, n. 3, p. 327-346, 2022.

ADRIANO, Maria Soraya Pereira Franco et al. Síndrome Respiratória Aguda Grave e a COVID-19 (SARS-Cov-2): uma revisão narrativa. **Enfermagem em Foco**, v. 11, n. 2. ESP, 2020.

ALMULLA, Abbas F. et al. Immune activation and immune-associated neurotoxicity in Long-COVID: A systematic review and meta-analysis of 103 studies comprising 58 cytokines/chemokines/growth factors. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2024.

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. 10.1128/jvi. 01276-21, 2021.

ARCHAMBAULT, Patrick M. et al. Post-COVID-19 condition symptoms among emergency department patients tested for SARS-CoV-2 infection. **Nature communications**, v. 15, n. 1, p. 8449, 2024.

ARIFA, Raquel DN et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1β and IL-18 in mice. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 7, p. 2023-2034, 2014.

ARIFA, Raquel Duque Nascimento et al. Reduction in the number of neutrophils in the broncho-alveolar aspirate is associated with worse prognosis in elderly patients with severe COVID-19. **Inflammation Research**, v. 72, n. 5, p. 929-932, 2023.

AWATADE, Nikhil T. et al. The complex association between COPD and COVID-19. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 11, p. 3791, 2023.

BERTOLETTI, Antonio; LE BERT, Nina; TAN, Anthony T. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. **Immunity**, 2022.

BIALEK, Stephanie R. et al. First confirmed cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection in the United States, updated information on the epidemiology of MERS-CoV infection, and guidance for the public, clinicians, and public

health authorities—May 2014. **American Journal of Transplantation**, v. 14, n. 7, p. 1693-1699, 2014.

BIANCHI, Erika do Nascimento et al. Prevalência de infecção por SARS-CoV-2 e fatores associados em pessoas privadas de liberdade no Espírito Santo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, p. e00094721, 2022.

BISTAGNINO, Filippo et al. Long COVID and gut candidiasis: What is the existing relationship?. **World Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 37, p. 4104, 2024.

BÓRTOLI, Romina Georgina et al. Pulmonary candidiasis associated with severe COVID-19: Case reporte. Hospital nacional El Salvador. **International Journal of Clinical Case Reports and Reviews**, 2021.

CAVALLAZZI, Rodrigo; RAMIREZ, Julio. Community-acquired pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 173-181, 2020.

CHEN, Chun-Jen; MAKINO, Shinji. Murine coronavirus replication induces cell cycle arrest in G0/G1 phase. **Journal of virology**, v. 78, n. 11, p. 5658-5669, 2004.

CHEON, I. S. et al. Immune signatures underlying post-acute COVID-19 lung sequelae. **Sci Immunol 6**: eabk1741 [em linha]. 2021.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature reviews microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

CUI, Wen et al. The crystal structure of main protease from mouse hepatitis virus A59 in complex with an inhibitor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 511, n. 4, p. 794-799, 2019.

DA COSTA, Vivaldo Gomes; MORELI, Marcos Lázaro; SAIVISH, Marielena Vogel. The emergence of SARS, MERS and novel SARS-2 coronaviruses in the 21st century. **Archives of virology**, v. 165, n. 7, p. 1517-1526, 2020.

DAVIS, Hannah E. et al. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews Microbiology,** v. 21, n. 3, p. 133-146, 2023.

DE OLIVEIRA, Matheus Márcio et al. Sintomas de depressão em trabalhadores da saúde durante a pandemia de COVID-19: Estudo transversal. **Enfermería Actual en Costa Rica**, n. 47, 2024.

DE SÁ VILELA FILHO, Alexander et al. Vacinas para Covid-19: Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 1880-1901, 2022.

DELISLE, Marie-Soleil et al. The clinical significance of Candida colonization of respiratory tract secretions in critically ill patients. **Journal of critical care**, v. 23, n. 1, p. 11-17, 2008.

DI FUSCO, Manuela et al. Public health impact and economic value of booster vaccination with Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine, bivalent (Original and Omicron BA. 4/BA. 5) in the United States. **Journal of Medical Economics**, v. 26, n. 1, p. 509-524, 2023.

DOBEŠ, Jan et al. Extrathymic expression of Aire controls the induction of effective TH17 cell-mediated immune response to Candida albicans. **Nature immunology**, v. 23, n. 7, p. 1098-1108, 2022.

DOCHERTY, Annemarie B. et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. bmj, v. 369, 2020.

FAN, Bingwen Eugene et al. Delayed catastrophic thrombotic events in young and asymptomatic post COVID-19 patients. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 51, p. 971-977, 2021.

FIROUZABADI, Negar et al. Update on the effectiveness of COVID-19 vaccines on different variants of SARS-CoV-2. **International immunopharmacology**, v. 117, p. 109968, 2023.

FIUZA, Laís Valéria Rezende et al. Ciclo de replicação e diagnóstico da infecção pelo SARS-COV-2. **Revista Fontes Documentais**, 2020.

GARG, Mandeep et al. The conundrum of 'long-COVID-19: a narrative review. **International journal of general medicine,** p. 2491-2506, 2021.

GEORGINA, B.R. et al. Pulmonary Candidiasis Associated with Severe COVID-19: Case Report. **International Journal of Clinical Case Reports and Reviews**. Auctores Publishing LLC, vol. 8, no 5, outubro de 2021.

GOMES, Bruno Belmonte Martinelli et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on COVID-19 symptomatology and severity during five waves. **Heliyon**, v. 10, n. 22, 2024.

GOZZI-SILVA, Sarah Cristina et al. Generation of cytotoxic T cells and dysfunctional CD8 T cells in severe COVID-19 patients. **Cells**, v. 11, n. 21, p. 3359, 2022.

GUSEV, Evgenii et al. SARS-CoV-2-specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 3, p. 1716, 2022

HASTIE, Claire E. et al. Natural history of long-COVID in a nationwide, population cohort study. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 3504, 2023.

HERNÁNDEZ-ACEITUNO, Ana; GARCÍA-HERNÁNDEZ, Abigail; LARUMBE-ZABALA, Eneko. COVID-19 long-term sequelae: Omicron versus Alpha and Delta variants. **Infectious Diseases Now**, v. 53, n. 5, p. 104688, 2023.

HILLARY, Varghese Edwin; CEASAR, Stanislaus Antony. An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines. **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.

HOENIGL, Martin et al. COVID-19-associated fungal infections. **Nature microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1127-1140, 2022.

HOGG, James C.; MACKLEM, Peter T.; THURLBECK, W. M. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. **New England Journal of Medicine**, v. 278, n. 25, p. 1355-1360, 1968.

HOSHINO, Tomoaki et al. Pulmonary inflammation and emphysema: role of the cytokines IL-18 and IL-13. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 176, n. 1, p. 49-62, 2007.

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.

JUSTO AREVALO, Santiago et al. What do we know about the function of SARS-CoV-2 proteins?. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1249607, 2023.

KAYESH, Mohammad Enamul Hoque; KOHARA, Michinori; TSUKIYAMA-KOHARA, Kyoko. An overview of recent insights into the response of TLR to SARS-CoV-2 infection and the potential of TLR agonists as SARS-CoV-2 vaccine adjuvants. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2302, 2021

KOBLISCHKE, Maximilian et al. Dynamics of CD4 T cell and antibody responses in COVID-19 patients with different disease severity. **Frontiers in medicine**, v. 7, p. 592629, 2020.

KOERNER, 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.

KONDELKOVÁ, Katerina et al. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 53, n. 2, p. 73-7, 2010.

KREUTZBERGER, Alex JB et al. SARS-CoV-2 requires acidic pH to infect cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 38, p. e2209514119, 2022.

KURRA, Nithin et al. Opportunistic infections in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Cureus**, v. 14, n. 3, 2022.

LAGREE, Katherine; CHEN, Peter. Candida makes a lasting impression in COVID-19. **Nature Immunology**, v. 24, n. 11, p. 1782-1784, 2023.

LAO, Peizhen et al. Regulatory T cells in lung disease and transplantation. **Bioscience Reports**, v. 43, n. 10, 2023.

LE BERT, Nina et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 457-462, 2020.

LI, Geng et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 424-432, 2020.

LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa; DE SOUSA, Maisa Silva; LIMA, Karla Valéria Batista. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2020.

LIONAKIS, Michail S.; DRUMMOND, Rebecca A.; HOHL, Tobias M. Immune responses to human fungal pathogens and therapeutic prospects. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-20, 2023.

LIU, Jie et al. A comparative overview of COVID-19, MERS and SARS. **International journal of surgery**, v. 81, p. 1-8, 2020.

LOPES, José Pedro; LIONAKIS, Michail S. Pathogenesis and virulence of Candida albicans. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.

LU, Bo et al. Integrated characterization of SARS-CoV-2 genome, microbiome, antibiotic resistance and host response from single throat swabs. **Cell discovery**, v. 7, n. 1, p. 19, 2021.

LU, Y. I. Q. I.; LU, Xiaotao; DENISON, Mark R. Identification and characterization of a serine-like proteinase of the murine coronavirus MHV-A59. **Journal of virology**, v. 69, n. 6, p. 3554-3559, 1995.

MAGAZINE, Nicholas et al. Mutations and evolution of the SARS-CoV-2 spike protein. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 640, 2022.

MASOPUST, David; AHMED, Rafi. Reflections on CD8 T-cell activation and memory. **Immunologic research**, v. 29, p. 151-160, 2004.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

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

MONOSON, Alexys et al. Air pollution and respiratory infections: the past, present, and future. **Toxicological sciences**, v. 192, n. 1, p. 3-14, 2023.

MOSER, Dominique et al. COVID-19 impairs immune response to Candida albicans. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 640644, 2021.

MOSS, Paul. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nature immunology**, v. 23, n. 2, p. 186-193, 2022.

NADEEM, Muhammad Shahid et al. Origin, potential therapeutic targets and treatment for coronavirus disease (COVID-19). **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 307, 2020.

NOBLE, Suzanne M.; GIANETTI, Brittany A.; WITCHLEY, Jessica N. Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96-108, 2017.

NÚÑEZ-FERNÁNDEZ, Marta et al. Alterations in respiratory function test three months after hospitalisation for COVID-19 pneumonia: value of determining nitric oxide diffusion. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 10, p. 2119, 2021.

OLIVEIRA, Vivian Louise Soares et al. The glycosaminoglycan-binding chemokine fragment CXCL9 (74–103) reduces inflammation and tissue damage in mouse models of coronavirus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1378591, 2024.

PASCOAL, David Balbino et al. Síndrome Respiratória Aguda: uma resposta imunológica exacerbada ao COVID19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 2978-2994, 2020.

PEKAR, Jonathan E. et al. The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. **Science**, v. 377, n. 6609, p. 960-966, 2022.

PELUSO, Michael J. et al. Systems analysis of innate and adaptive immunity in Long COVID. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, 2024. p. 101873.

PEMÁN, Javier et al. Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be concerned?. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 37, n. 2, p. 41-46, 2020.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439-450, 2009.

PRIMORAC, Dragan et al. Adaptive immune responses and immunity to SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 848582, 2022.

Proal AD, VanElzakker MB. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms. **Front Microbiol**. 2021 Jun 23;12:698169.

PROMPETCHARA, Eakachai; KETLOY, Chutitorn; PALAGA, Tanapat. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic**. Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2020.

RAVEENDRAN, A. V.; JAYADEVAN, Rajeev; SASHIDHARAN, S. Long COVID: an overview. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 15, n. 3, p. 869-875, 2021.

REHMAN, S. U. et al. Evolutionary trajectory for the emergence of novel coronavirus SARS-CoV-2. Pathogens. 2020.

SADEGHI, Armin et al. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. **Journal of cellular physiology**, v. 236, n. 4, p. 2829-2839, 2021.

SANTA CRUZ, André et al. Post-acute sequelae of COVID-19 is characterized by diminished peripheral CD8+ β7 integrin+ T cells and anti-SARS-CoV-2 IgA response. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1772, 2023.

SANTA CRUZ, André et al. Post-acute sequelae of COVID-19 is characterized by diminished peripheral CD8+ β7 integrin+ T cells and anti-SARS-CoV-2 IgA response. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1772, 2023.

SANZ, J. Monserrat; LAHOZ, AM Gómez; MARTÍN, R. Oliva. Papel del sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: inmunopatología de la COVID-19. **Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 13, n. 33, p. 1917-1931, 2021.

SCOTT, Nicholas A. et al. Monocyte migration profiles define disease severity in acute COVID-19 and unique features of long COVID. **European Respiratory Journal**, v. 61, n. 5, 2023.

SEELBINDER, Bastian et al. Candida expansion in the gut of lung cancer patients associates with an ecological signature that supports growth under dysbiotic conditions. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2023.

SHEIKH, Daniya et al. Clinical outcomes in patients with COPD hospitalized with SARS-CoV-2 versus non-SARS-CoV-2 community-acquired pneumonia. **Respiratory Medicine**, v. 191, p. 106714, 2022.

SHUWA, Halima A. et al. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. **Med**, v. 2, n. 6, p. 720-735. e4, 2021.

SILVA, D. L. et al. Fungal and bacterial coinfections increase mortality of severely ill COVID-19 patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 113, p. 145-154, 2021.

SILVA-JUNIOR, Alexander Leonardo *et al*. Mediators profile in COVID-19 convalescence: an approach in individuals from amazon. 2024.

SOUZA, Danielle G. et al. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **European journal of pharmacology**, v. 403, n. 1-2, p. 121-128, 2000.

SOUZA, Danielle G. *et al*. Neutrophils in the context of polymicrobial sepsis. **Neutrophils in Infectious Diseases; Tacchini-Cottier, F., van Zandbergen, G., Eds**, p. 20-36, 2011.

SWIDERGALL, Marc; LEIBUNDGUT-LANDMANN, Salomé. Immunosurveillance of Candida albicans commensalism by the adaptive immune system. **Mucosal immunology**, v. 15, n. 5, p. 829-836, 2022.

TALAPKO, Jasminka et al. Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TANG, Yujun et al. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1708, 2020.

TENFORDE, Mark W. et al. Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a multistate health care systems network—United States, March–June 2020. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 30, p. 993, 2020.

TORRES-CASTRO, Rodrigo et al. Respiratory function in patients post-infection by COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Pulmonology**, v. 27, n. 4, p. 328-337, 2021.

VIJAYAKUMAR, Bavithra et al. Immuno-proteomic profiling reveals aberrant immune cell regulation in the airways of individuals with ongoing post-COVID-19 respiratory disease. **Immunity**, v. 55, n. 3, p. 542-556. e5, 2022.

VILLASEÑOR-ALTAMIRANO, Ana B. et al. Activation of CD8+ T Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 208, n. 11, p. 1177-1195, 2023.

WANG, Yifei et al. The role of CD4+ FoxP3+ regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 6, p. 1507, 2021.

WHEATLEY, Adam K. et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1162, 2021.

World Health Organization et al. COVID-19 weekly epidemiological update, 9 March 2021.

World Health Organization. 2025, acesso: 01 de janeiro. Disponível em: https://covid19.who.int

YANG, Haitao; RAO, Zihe. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685-700, 2021

YANG, Zhangsheng et al. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. **Virologica sinica**, v. 29, p. 393-402, 2014.

YÜCE, Meral; FILIZTEKIN, Elif; ÖZKAYA, Korin Gasia. COVID-19 diagnosis—A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 2021.

ZANZA, Christian et al. Cytokine storm in COVID-19: immunopathogenesis and therapy. **Medicina**, v. 58, n. 2, p. 144, 2022.

ZARRILLI, Giovanni et al. The immunopathological and histological landscape of COVID-19-mediated lung injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 974, 2021.