



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

MARIANA QUITÉRIA DE MORAIS SILVA

**INFLUÊNCIA DO CONTATO PRÉVIO COM BCG *IN VITRO* NA RESPOSTA
IMUNE DE MEMÓRIA MEDIADA POR MONÓCITO AO SARS-COV-2 DE
INDIVÍDUOS SENSIBILIZADOS PARA *Schistosoma mansoni***

RECIFE
2024

MARIANA QUITÉRIA DE MORAIS SILVA

**INFLUÊNCIA DO CONTATO PRÉVIO COM BCG *IN VITRO* NA RESPOSTA
IMUNE DE MEMÓRIA MEDIADA POR MONÓCITO AO SARS-COV-2 DE
INDIVÍDUOS SENSIBILIZADOS PARA *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em medicina tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

**RECIFE
2024**

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Mariana Quitéria de Moraes.

Influência do contato prévio com BCG in vitro na resposta imune de memória mediada por monócito ao SARS-COV-2 de indivíduos sensibilizados para Schistosoma mansoni / Mariana Quitéria de Moraes Silva. - Recife, 2024.

61f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Valdênia Maria Oliveira de Souza.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Esquistossomose; 2. SARS-CoV-2; 3. Monócitos. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MARIANA QUITÉRIA DE MORAIS SILVA

**INFLUÊNCIA DO CONTATO PRÉVIO COM BCG *IN VITRO* NA RESPOSTA
IMUNE DE MEMÓRIA MEDIADA POR MONÓCITO AO SARS-COV-2 DE
INDIVÍDUOS SENSIBILIZADOS PARA *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em medicina tropical.

APROVADO EM: 30/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Vladia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dra. Cássia Giselle de Oliveira Nóbrega (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Roekson Carlos Peixoto Silva (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas as vezes que precisei de forças para continuar e ele segurou a minha mão, me fazendo chegar até aqui, mesmo com todas as dificuldades encontradas no caminho.

Agradecer aos meus pais, Gilvanete e Antônio, por sempre me apoiar e mostrar que sou capaz de tudo. Amo vocês.

À minha avó, que por meio de suas orações, me enviou sabedoria para lidar com os imprevistos.

À toda equipe do Arruda Diagnóstico por me ajudar nas vezes que precisei me ausentar do trabalho, fazendo uma força tarefa para que eu não me sentisse sobrecarregada quando retornasse.

À Prof^ª Valdênia Souza, responsável por esse trabalho, pela oportunidade, paciência e orientação. Obrigada pela sua disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo.

À Cássia, por toda dedicação e paciência para ensinar os procedimentos realizados no projeto, que sem dúvidas foi extremamente importante para conclusão do projeto.

À Jenyffer pela contribuição incansável para finalização dos experimentos, sua ajuda foi de inestimável importância para a finalização do projeto.

Aos meus companheiros de laboratório: Edmilsom, Thaís, João Mateus que forneceram grande ajuda em todos os procedimentos experimentais, acompanhou o desenvolvimento da pesquisa e prestou ajuda incondicional. O sucesso do trabalho só foi alcançado devido às contribuições de vocês.

A todos do Ilika e do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para o andamento do projeto.

A equipe de Escada, que nos ajudou no recrutamento de pacientes.

RESUMO

A memória inata ou imunidade treinada vem sendo demonstrada em resposta ao BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), seja em protocolos vacinais ou *in vitro*. Os monócitos produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 e quimiocinas em concentrações maiores frente a um segundo estímulo, seja este homólogo ao BCG ou não-relacionado, como exemplo o SARS-CoV-2. Contudo, não está esclarecida a influência da resposta ao *S. mansoni* neste fenômeno. Sendo assim, neste estudo, foi avaliado se existe diferença entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias tipo 1 (IL-6, TNF- α), tipo Th2 (CCL5) ou perfil regulatório (IL-10) no sobrenadante de cultura de monócitos previamente estimulados por BCG (10 μ g/ml; 24 horas; 1º estímulo) e em contato posterior com SARS-Cov-2 (1 μ g/ml 3 dias depois; 2º estímulo) de indivíduos de área endêmica para esquistossomose (IgG+ para SEA/SWAP) em comparação aos de área não endêmica (IgG-). A dosagem de citocinas foi realizada por CBA, sendo possível observar uma tendência do 1º estímulo com BCG induzir produção maior de TNF nos indivíduos IgG+ em comparação àqueles IgG-, enquanto a produção de IL-10 foi semelhante nestes dois grupos. Houve produção basal (apenas meio) de IL-6 e CCL5 e não houve diferença nos níveis destas citocinas quando os monócitos, seja de indivíduos sensibilizados ou não, foram estimulados com BCG. O segundo estímulo com SARS-Cov-2 não induziu a produção das TNF, IL-10 e CCL5. Contudo, houve uma tendência maior produção de IL-6 nas culturas estimuladas com SARS-Cov-2 em indivíduos IgG- quando comparados aos IgG+, independente da estimulação *in vitro* com BCG. Então, nas condições de cultivo utilizadas, a infecção prévia com *S. mansoni* potencializou a produção de TNF em resposta ao BCG. A memória treinada pôde ser revelada pela maior produção de IL-6 em resposta aos antígenos virais, mas a infecção prévia com *S. mansoni* parece diminuir esta produção. Estudos adicionais serão necessários para confirmar se a memória treinada foi induzida pela vacinação prévia com BCG ou SARS-Cov-2

Palavras-chave: Esquistossomose; Citocinas; Monócitos; BCG; SARS-CoV-2

ABSTRACT

Innate memory or trained immunity has been demonstrated in response to BCG (Bacillus Calmette-Guérin), both in vaccination protocols and in vitro. Monocytes produce pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, and chemokines in higher concentrations in response to a secondary stimulus, whether it is homologous to BCG or unrelated, such as SARS-CoV-2. However, the influence of the response to *Schistosoma mansoni* on this phenomenon is not yet clear. Therefore, this study evaluated whether there is a difference in the levels of type 1 pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α), Th2 type cytokines (CCL5), or regulatory profile cytokines (IL-10) in the supernatant of monocyte cultures previously stimulated with BCG (10 μ g/ml; 24 hours; 1st stimulus) and later exposed to SARS-CoV-2 (1 μ g/ml 3 days later; 2nd stimulus) from individuals in an endemic area for schistosomiasis (IgG+ for SEA/SWAP) compared to those from a non-endemic area (IgG-). Cytokine quantification was performed by CBA, revealing a trend for the 1st stimulus with BCG to induce higher TNF production in IgG+ individuals compared to IgG- individuals, while IL-10 production was similar in these two groups. Basal production of IL-6 and CCL5 was observed, with no difference in the levels of these cytokines when monocytes, whether from sensitized individuals or not, were stimulated with BCG. The second stimulus with SARS-CoV-2 did not induce production of TNF, IL-10, and CCL5. However, there was a trend toward higher production of IL-6 in cultures stimulated with SARS-CoV-2 in IgG- individuals compared to IgG+ individuals, regardless of in vitro stimulation with BCG. Thus, under the cultivation conditions used, prior infection with *S. mansoni* enhanced TNF production in response to BCG. Trained immunity was revealed by the higher production of IL-6 in response to viral antigens, but prior infection with *S. mansoni* seems to reduce this production. Further studies will be necessary to confirm whether trained immunity was induced by prior vaccination with BCG or SARS-CoV-2.

Keywords: Schistosomiasis; Cytokines; SARS-CoV-2; Monocytes; BCG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mecanismo de ação dos interferons α e β

Figura 2: Resposta imunológica na Esquistossomose

Figura 3: Etapas de purificação e cultura de monócitos sob estímulo de BCG e SARS-CoV2

Figura 4: Níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e CCL5 em cultura de monócitos de pacientes positivos para anticorpos IgG anti-SEA/SWAP (IgG+) e em pacientes negativos (IgG-), dosadas por CBA.

TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população de estudo quanto ao gênero, idade, infecção com Sars-CoV-2, vacinação (doses) para Covid-19 e positividade IgG anti-SEA/SWAP

LISTA DE ABREVIACOES

- COVID - 19** - Corona Virus Disease – 19 (Doença do Coronavírus)
- IFN- γ** - Interferon gama
- IgG** - Imunoglobulina (G)
- IL** - Interleucina
- SARS-CoV- 2** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2)
- Th-1** T helper 1
- Th-2** T helper 2
- Treg** - Linfócitos T regulatórios
- MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade
- IgG2b** - Imunoglobulina (G2b)
- TGF- β** -Transforming growth factor-Beta (Fator de transformação do crescimento – Beta)
- BCG** – Bacilo de Calmette e Guérin
- TNF**- fator de necrose tumoral
- NO** - xido nítrico
- TB**- Tuberculose
- PAMP** – Padrão molecular associado ao patógeno
- DAMP** – Padrão molecular associado ao dano
- CP**- Controle Positivo
- CN**- Controle Negativo

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 IMUNIDADE INATA E MONÓCITO	14
2.2 INFECÇÃO VIRAL.....	18
2.3 COVID-19.....	20
2.4 ESQUISTOSSOMOSE E A IMUNOMODULAÇÃO	22
2.6 VACINA BCG E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR	26
OBJETIVOS.....	29
GERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	30
4.2 DESENHO DE ESTUDO	30
4.3 LOCAL DE ESTUDO.....	30
4.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
4.5 RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES E INSTRUMENTOS PARA COLETA DOS DADOS.....	31
4.6 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	32
4.7 CULTURA DE MONÓCITO E ESTÍMULO POR BCG E SARS-CoV-2	32
4.8 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS DA ESQUISTOSSOMOSE	34
4.9 DOSAGEM DE IgG ANTI-SEA E ANTI-SWAP PARA CONFIRMAÇÃO DOS GRUPOS	35
4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUIMIOKINAS E CITOCINAS	35
4.11 FLUXOGRAMA	37
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIA.....	45
ANEXOS.....	52
Anexo II – Comprovante de submissão ao Comitê de ética em Pesquisa.....	57
Anexo IV – Carta de anuência da Secretaria de Saúde de Escada (local onde foram selecionados os pacientes).....	59
.....	59
APÊNDICES.....	60

INTRODUÇÃO

Na infecção pelo *S. mansoni* a imunidade adaptativa Th2/Treg interfere na resposta imune para antígenos heterólogos, a exemplo das condições alérgicas que modula a resposta imune do hospedeiro e induz a proteção contra tal condições (MACHADO, 2004; SILVA et al., 2021 DE OLIVEIRA NÓBREGA et al, 2021). Do mesmo modo, tem sido demonstrado que a memória inata, quando treinada pela vacinação com bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG) pode também alterar o curso da resposta imune para antígenos também heterólogos (COVIAN et al., 2019). Contudo, não está estabelecido se a infecção esquistossomótica e/ou vacinação BCG alteram a resposta imune ao SARS-COV 2.

A infecção por *S. mansoni* induz elevados níveis de citocinas do perfil de células Th2 que inibe a diferenciação em Th1 e Th17 (VERSINI et al., 2015; JANSSEN et al., 2016). Em relação à esquistossomose e a resposta antiviral, em camundongos, houve diminuição das respostas das células T citotóxicas CD8+ específicas do vírus e das citocinas Th1, bem como retardo na eliminação viral (ACTOR et al., 1994). Do contrário, foi demonstrado uma melhora na resposta imune de memória Th1/CD8 em camundongos infectados com Herpes Vírus 4 (MuHV-4) onde houve redução da gravidade (ROLOT et al., 2018). KAMAL *et al*, 2021 observaram que o curso da infecção pelo vírus da hepatite C foi alterado em indivíduos esquistossomóticos: exibindo um padrão clínico, virológico e histológico peculiar manifestado por persistência viral com altos títulos de RNA, assim como elevada necrose, inflamação e fibrose. Contudo, outro estudo mostrou que a presença de parasitas pode favorecer a modulação do sistema imunológico do paciente para combater a COVID-19 (WOLDAY D et al, 2021).

A respeito da interação antígeno parasitário e a co-infecção helmíntica e SARS-CoV2, foi demonstrado por alguns estudos que pode ser uma alternativa para evitar formas mais severas da COVID-19, dado o histórico destes parasitas quanto à modulação da resposta inflamatória (SSEBAMBULIDDE K et al, 2020). Sabe-se que infecções crônicas por helmintos estão associadas ao aumento do número de células Treg, macrófagos M2 e eosinófilos, sendo esse aumento benéfico para o hospedeiro no sentido de promoção de reparo e recuperação, evitar danos excessivos e equilíbrio imune. De acordo com outros autores, estudos mostram uma redução no número de casos de

infecções causadas pelo SARS-Cov-2 em regiões endêmicas por parasitoses como malária, esquistossomose e geohelmintíase (SILVA, 2021) . Essa resposta imunomoduladora tem sido utilizada para embasar a lentidão do crescimento da curva da COVID-19 na África em 2020 (SSEBAMBULIDDE K ET AL, 2020).

Em relação ao BCG um estudo mostrou que monócitos “treinados” por BCG têm uma produção significativamente maior de várias citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ), TNF-alfa, IL-1, IL-2, IL-12 e IL-18 (VASHISHTHA, 2020). Em estudos epidemiológicos, em países onde o BCG é administrado aos neonatos, revelaram que a redução da mortalidade neonatal e infantil parece ser devido à indução de proteção contra agentes infecciosos não relacionados, como os patógenos causadores de sepse neonatal ou infecções graves do trato respiratório (GYSENS et al., 2019). Um efeito semelhante da BCG na infecção do trato respiratório foi encontrado em pessoas idosas, onde foram vacinados uma vez no mês durante três meses para examinar tal efeito, foi observado que houve uma redução significativa nas infecções do trato respiratório quando comparado com o efeito placebo (WARDHANA et al., 2011).

É de conhecimento que o *S. mansoni* é excelente modulador da resposta imunológica, uma vez que induzem uma tolerância do organismo ao invasor através do equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, assim como a BCG. Contudo, ainda não existem estudos que relatam a influência da resposta por *S. Mansoni*, BCG e SARS-Cov-2 entre si. No presente estudo foram avaliados a produção de citocinas pró-inflamatórias tipo 1 (IL-6, TNF- α) e Th2/Treg (CCL5), perfil regulatório (IL-10), em monócitos de indivíduos adultos infectados por *S. mansoni*, quando reestimulados com o antígeno do BGC e posteriormente com o antígeno do vírus. Sendo assim, pretende-se observar se a geração de imunidade treinada pela vacinação por BCG frente ao SARS-Cov-2 e a influência da prévia da infecção esquistossomótica neste fenômeno.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNIDADE INATA E MONÓCITO

O sistema imunológico tem como finalidade manter o organismo livre de infecções, seja ela viral, bacteriana e parasitária, fazendo um reconhecimento de tudo que é estranho para o corpo (ABBAS, 2007). A função imunológica tem sido conceitualmente dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata mais rápida e inespecífica e a adaptativa mais lenta, porém criando um reconhecimento específico e mecanismos especializados para cada agente agressor (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta imune inata, como já citado, apresenta uma resposta mais rápida, sendo caracterizada pela representação de barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e que não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). As principais células efetoras da imunidade inata são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killer* (TURVEY et al., 2010). Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta imune inata não é completamente inespecífica, como originalmente se pensava, sabe-se que existe uma especificidade do reconhecimento imune inato para combater microrganismos, mas que é diferente da especificidade do sistema imune adaptativo em vários aspectos (AKIRA et al., 2006). O sistema imune inato evoluiu e passou a reconhecer estruturas moleculares que são produzidas pelos patógenos microbianos, essas estruturas são chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) (CRUVINEL et al., 2010). Diferentes tipos de microrganismos expressam diferentes PAMPs (MURPHY et al., 2014) Essa característica do reconhecimento imune inato é importante porque garante que os alvos da imunidade inata não possam ser descartados pelos microrganismos em um esforço para evadir o reconhecimento pelo hospedeiro (ABBAS, 2003).

O sistema imune inato também reconhece moléculas endógenas que são produzidas ou liberadas de células danificadas ou mortas. Essas substâncias são chamadas de padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) são mensagens endógenas liberadas pelas células do organismo em resposta a danos celulares, lesões ou estresse tecidual (CHEN, GY, & NUNEZ, G., 2010). Ao contrário dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), que são transmitidos por patógenos, os DAMPs são sinalizados pelo próprio organismo que indicam a presença de danos celulares ou teciduais e desencadeiam uma resposta imune inata e inflamatória. Quando ocorre dano celular, seja devido a infecções, lesões, traumas, necrose ou outras causas, as células liberam DAMPs no ambiente circundante. Essas moléculas funcionam como sinais de alarme para o sistema imunológico, alertando-o sobre o dano tecidual e a necessidade de uma resposta inflamatória (ZINDEL J e et al, 2020).

O sistema imune inato usa vários tipos de receptores celulares, presentes em diferentes localizações nas células, e moléculas solúveis no sangue e secreções mucosas para reconhecer PAMPs e DAMPs (TAKEUCHI O, AKIRA S., 2010). Essas moléculas padrão associadas a patógenos estimulam dois tipos de respostas imunes inatas - fagocitose por células como neutrófilos e macrófagos e resposta inflamatória. Ambas as respostas podem ocorrer rapidamente, mesmo que o hospedeiro nunca tenha sido exposto a um determinado patógeno, dessa forma, a ativação da imunidade inata a partir da associação entre os eceptores de Reconhecimento de Padrões e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PRR-PAMP) é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (ABBAS, 2003).

Quanto aos RRP existem vários envolvidos em opsonização, ativação de complemento e fagocitose (CRUVINEL, 2010). Os Toll-like (TLRs) se destacam por seu papel central na ligação a patógenos e na iniciação da resposta inflamatória. Outros receptores presentes em fagócitos, com importante papel na resposta imune, são aqueles para frações do complemento, citocinas, interleucinas e imunoglobulinas (tipo Fc γ R) (ABBAS, 2003)

Os TLRs são proteínas transmembranas altamente conservadas que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos, bem como na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (KAWAI, 2010). Os receptores Toll-Like 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, de modo que eles contêm domínios intracelular, devido à presença de proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) e extracelular (repetições ricas

em leucina - LRR), enquanto que os receptores Toll-Like 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente (MCGETTRICK AF, 2010). Cada receptor Toll-Like tem sua própria via de sinalização intrínseca e induz respostas biológicas específicas contra microorganismos. Quando algum PAMP é reconhecido por algum receptor Toll-Like específico, a proteína MyD88 recruta as cinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) (O'NEILL LA, e et al., 2007). Este ativa o fator de crescimento β associado à cinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo IKK formado por duas subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) e por uma subunidade regulatória (NEMO/ IKK γ). Este complexo promove a fosforilação do I κ B e a sua degradação resulta no fator de transcrição nuclear (NF- κ B), que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias e das moléculas de adesão (HENNESSY EJ, 2010).

Além dos receptores Toll-LiKes, existem os receptores de reconhecimento de padrão citosólicos que servem para reconhecer moléculas microbianas (ABBAS, 2003). Esses receptores abrangem receptores do tipo RIG (RLRs), que reconhecem RNA viral, sensores de DNA citosólico (CDSs) e receptores do tipo NOD (NLRs), que reconhecem constituintes da parede celular bacteriana e também detectam cristais intracelulares, espécies reativas de oxigênio e vários outros indicadores de infecção ou lesão celular (ABBAS, 2003). Finalizando com as moléculas de reconhecimento de padrão solúveis e efetoras que são encontradas no plasma, incluindo as pentraxinas (p. ex., CRP), colectinas (p. ex., MBL) e ficolinas. Essas moléculas se ligam aos ligantes microbianos e aumentam a eliminação por mecanismos dependentes e independentes do complemento (MANTOVANI A, e et al, 2007). O BGC é um potente estimulador da resposta imune inata, conhecido por envolver receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como o receptor Toll-like (TLR)-2 e TLR-4, que estão localizados na superfície da membrana celular (SOTO et al, 2022)

Apesar dos complexos mecanismos de defesa contra vírus, as doenças virais continuam sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade. A resposta imune inata desempenha um papel crucial no combate às infecções virais. Nas fases iniciais da infecção, os interferons tipo I (IFN-a e IFN-b), macrófagos e células NK são fundamentais. As células infectadas produzem interferons, que protegem células não infectadas e facilitam a resposta imune adaptativa. Além disso, o IFN-g ativa macrófagos

e células NK, que destroem vírus e células infectadas por meio de granzimas e perforinas. A IL-12, produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, estimula as células NK a exercerem citotoxicidade e produzir mais IFN-g, aumentando assim o potencial microbicida dos macrófagos (MACHADO, Paulo RL et al., 2004).

Os monócitos são um tipo de célula sanguínea pertencente à família dos leucócitos, também conhecida como glóbulos brancos. Eles desempenham um papel crucial no sistema imunológico como parte da resposta imune inata (GEISSMANN F, e et al 2010). Os monócitos são produzidos na medula óssea a partir das células-tronco hematopoiéticas e, em seguida, são liberados na corrente sanguínea, onde circulam por um curto período antes de migrarem para os tecidos (ABBAS, 2003). Uma vez nos tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, dependendo do ambiente em que se encontram. Essa diferenciação é influenciada por fatores locais, incluindo sinais inflamatórios e fatores de crescimento. A capacidade de se diferenciar em células especializadas é uma das características distintivas dos monócitos e torna essa célula uma peça-chave no sistema imune (GEISSMANN F, e et al 2010).

Na inflamação, os macrófagos atuam como APCs, potencializando a ativação de linfócito T e linfócito B pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas (MOSSER DM, e et al., 2008) Os monócitos utilizam diferentes moléculas quimiotáticas para migrar; entretanto, CCL2 e CCL7 são produzidas rapidamente por células estromais e células imunes após a ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) ou depois da estimulação de citocinas. A CCL2 forma um dímero e se liga a glicosaminoglicanos da matriz extracelular, estabelecendo, dessa forma, um gradiente estável para os monócitos inflamatórios CCR2+ (PALOMINO, 2015) Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela sintetase do óxido nítrico induzível, iNOS, ausente em macrófagos em repouso, mas induzida por ativação de TLRs em resposta a PAMPs, especialmente na presença de IFN- γ (ABBAS, 2015). Quando a CCL5, monócitos humanos contêm um reservatório anteriormente não descrito da quimiocina pré-formada CCL5. Além disso, foi visto que o CCL5 poderia ser secretada a partir de

monócitos tratados com o inibidor da síntese protéica (cicloheximida) e o bloqueador de Golgi (brefeldina A) (PERSAUD AT e et, 2022).

Durante uma infecção por COVID-19, o organismo libera citocinas pró-inflamatórias para ativar células imunológicas fagocitárias, como os macrófagos, visando eliminar células infectadas e preservar a integridade dos tecidos. Esses macrófagos não apenas consomem patógenos e células mortas, mas também produzem citocinas que atraem mais macrófagos para o local da infecção (FUNG et al., 2020). Quando os macrófagos fagocitam células infectadas pelo SARS-CoV-2, ocorrem mudanças metabólicas, levando a uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e redução da capacidade fagocítica. Isso resulta no acúmulo de células nos tecidos, estimulando constantemente o sistema imune e desencadeando um estado de hiperinflamação, lesão tecidual e agravamento da doença (DOS SANTOS et al., 2021). Um estudo mostrou que esse acúmulo de células nos tecidos estimula o sistema imune constantemente, desencadeando a liberação de mais citocinas pró inflamatórias, ativando e atraindo mais macrófagos ao local da infecção, criando um ciclo que resulta na hiperinflação responsável pela lesão tecidual e agravamento da doença. Uma resposta imune controlada, a partir da ação correta de macrófagos e produção controlada de citocinas é essencial para a evolução benigna da COVID-19 (CASTANHOLA, M. E., 2022)

2.2 INFECÇÃO VIRAL

Os vírus são os microrganismos intracelulares obrigatórios que utilizam os componentes do ácido nucleico e a maquinaria da síntese de proteínas do hospedeiro para se replicar e se espalhar. (NAGY PD, e et al, 2008). Os vírus tipicamente infectam diversos tipos de células, utilizando moléculas de superfície de células normais como receptores para entrar nas células. Depois de entrar nas células, os vírus podem causar lesão tecidual e doença por uma série de mecanismos. A replicação viral interfere na síntese de proteína e função de células normais e leva à lesão e por fim à morte da célula infectada. Este resultado é um tipo de efeito citopático do vírus e a infecção é dita lítica porque a célula infectada é lisada (ABBAS, 2015).

O agravamento de quadros clínicos e a patogênese de morbidades virais sofrem envolvimento do sistema imune (MACHADO, 2004). Quando se pensa neste envolvimento, é sabido que a resposta imune adaptativa desempenha papel central na

melhoria das infecções virais, apesar disso, a resposta imune inata se mostra essencial no combate a estas condições, por exemplo, o reconhecimento através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) via receptores, desencadeia a liberação de citocinas, principalmente de interferon do tipo 1 e citocinas pró-inflamatórias, sendo estas últimas responsáveis por gerar respostas antivirais e ativação da imunidade adaptativa (SORDI et al., 2020). Quanto à imunidade inata, sabe-se que a ligação do vírus a Receptores Toll Likes (TLRs) ativa, via NF- κ B, a indução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6, principalmente nos casos mais graves, com um papel importante no início da inflamação induzida por vírus (AZKUR et al., 2020, QIN et al., 2020).

Os TLRs reconhecem componentes moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes nos vírus, como ácidos nucleicos virais (DNA ou RNA). Quando ocorre a ligação dos PAMPs aos TLRs há ativação de vias de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias que são cruciais para a mobilização inicial da resposta imune. A ativação dos TLRs não apenas estimula a resposta imune inata, mas também é crucial para a indução de uma resposta imune adaptativa específica contra o vírus. Isso ocorre através da apresentação de antígenos virais por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, que ativam linfócitos T para o vírus. Os TLRs também desempenham um papel na modulação da intensidade e da duração da resposta inflamatória durante a infecção viral. Isso é importante para equilibrar a defesa eficaz contra o vírus com a minimização do dano aos tecidos do hospedeiro. (ABBAS, 2015)

Quando a imunidade adaptativa é acionada ocorre uma ativação dos linfócitos TCD8+ que vão exercer citotoxicidade pelo reconhecimento de antígenos virais via MHC classe I nas células alvo, e consequente liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas e também dos vírus (MACHADO et al., 2004). O controle das infecções virais é feito pelos interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), pelos macrófagos e pelas células NK (CHADHA et al., 2004). Os interferons tipo I são produzidos por células infectadas por vírus e que interagindo com uma célula não infectada apresentam propriedade de protegê-la contra a infecção, além de colaborar com a resposta imune adaptativa. Quem também atua no combate a infecção viral é IFN γ mediante a ativação dos macrófagos com destruição dos vírus e também das células NK, onde com a liberação de granzima e perforina destroem as células infectadas (MACHADO, P. et al, 2004).

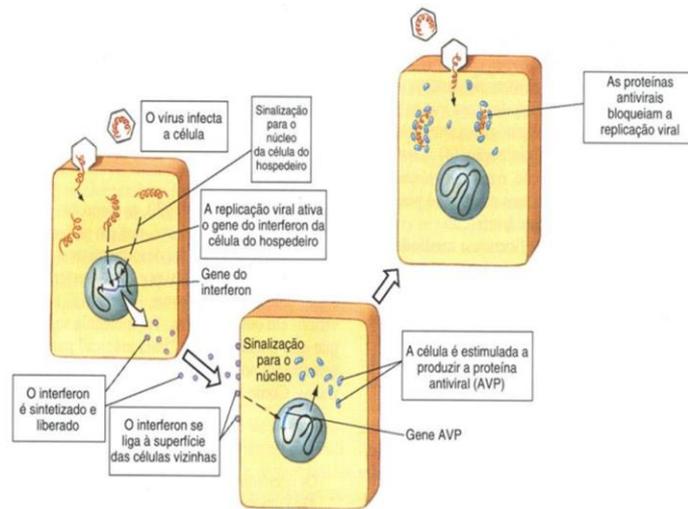


FIGURA 1: Mecanismo de ação dos interferons α e β
Fonte: Flores, EF 1ª edição

2.3 COVID-19

A covid-19 é uma doença causada por um vírus da família Coronaviridae, do gênero coronavirus, sendo a espécie denominada Sars-CoV-2, que foi identificada pela primeira vez na China, em dezembro de 2019. A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a epidemia é uma emergência de saúde pública de interesse internacional em 31 de janeiro de 2020 e relatou em 16 de abril de 2020, a infecção como emergente e que estava se espalhando pelo mundo (BULUT; KATO, 2020) causando 772.837.981 milhões de casos confirmados e mais 6.988.666 milhões de mortes no mundo (OMS, 2024).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os sinais/sintomas iniciais da doença lembram um quadro gripal comum, mas variam de indivíduo para indivíduo, podendo se manifestar de forma branda, em forma de pneumonia, pneumonia grave e síndrome respiratória aguda (SRAG) (EASTIN C, e et al, 2020). A maior parte das pessoas infectadas apresenta a forma leve da doença, com alguns sintomas como mal-estar, febre, fadiga, tosse, dispneia leve, anorexia, dor de garganta, dor no corpo, dor de cabeça ou congestão nasal, sendo que algumas também podem apresentar diarreia, náusea e vômito. Idosos e imunossuprimidos podem ter uma apresentação atípica e agravamento

rápido, o que pode levar ao óbito, principalmente dos idosos e indivíduos com comorbidades preexistentes (GUAN et al., 2020).

Após a entrada do SARS-CoV-2 pelas vias aéreas, o vírus adere à mucosa do epitélio respiratório, a partir do reconhecimento e da ligação da proteína viral de superfície, denominada proteína Spike (S), ao receptor tecidual, chamado enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (VADUGANATHAN et al., 2020; DANSEN, 2020), proteína que medeia a entrada do vírus na célula-alvo. O tropismo por essas células repercute na manifestação de sintomas, majoritariamente, respiratórios. Entretanto, a presença desse receptor em outros tecidos, como o cardíaco, o renal e o intestinal, também contribui para outras manifestações clínicas (DANSEN, 2020). Após o processo de reconhecimento, o envelope viral funde-se à membrana citoplasmática do hospedeiro, permitindo a entrada do vírion no citoplasma da célula. O SARS-CoV-2 também pode ser endocitado pela célula-alvo. Uma vez que no endossomo, segue para o citoplasma e libera o ácido ribonucleico (RNA) viral de fita simples com sentido positivo, permitindo a síntese de proteínas estruturais e não estruturais, dessa forma, dando início ao processo de replicação viral. As partículas virais são transportadas, ligando-se ao retículo endoplasmático (RE), e transferidas para o complexo de Golgi. Por fim, vesículas que contêm as partículas virais se fundem com a membrana citoplasmática, promovendo a liberação por brotamento (LI et al., 2020).

Estudos feitos com pacientes doentes por COVID-19 apresentaram concentrações elevadas de 18 citocinas pró e anti-inflamatórias (TRAIL, M-CSF, GRO- α , G-CSF, IL-6, IL-2, β -NGF, IL-10, MCP-1, SCF, IL-15, IL-8, IL-7, IP-10, PDGF-BB, IFN- γ , IL-18, IL-2R α) foram observadas no grupo sintomático em comparação ao grupo assintomático (LONG et al., 2020). Em comparação com controles saudáveis, os pacientes com COVID-19, apresentam uma diminuição no número de linfócitos totais, células T CD4+, células T CD8+, células B e células NK e nos casos graves essa diminuição foi ainda maior (WANG et al., 2020). Além disso, foi relatado uma diminuição de células de memória (CD3+, CD4+, CD45RO+) e de células T regulatórias - Treg (CD3+, CD4+, CD25+, CD127low+) em casos graves quando comparados com casos não graves (QIN et al., 2020). Em relação à imunidade inata, sabe-se que a ligação do vírus a Receptores Toll Likes (TLRs) ativa, via NF- κ B, a indução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-6, principalmente nos casos mais graves, com um papel importante no início da

inflamação induzida por vírus. No entanto, os conhecimentos sobre esses fatores ainda são raros (AZKUR et al., 2020, QIN et al., 2020).

Vanderbeke, L. e et al, 2021 avaliaram citocinas e perfis imunes multiplex em pacientes com COVID-19, observaram que Os níveis de IL-6, IL-10, IL-15, IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4, CCL26, CXCL9 e CXCL10 foram significativamente elevados na condição clínica crítica de COVID-19 em comparação aos pacientes saudáveis, além disso foi relatado que no nível de citocinas/ quimiocinas, os pacientes com COVID-19 crítico, em comparação com os pacientes com COVID-19 leve a moderado.

A COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, marcou uma nova era na história da saúde global. Desde sua emergência em 2019, a pandemia provocou uma transformação sem precedentes na sociedade, economia e ciência. A resposta global incluiu esforços sem precedentes de colaboração internacional, desenvolvimento acelerado de vacinas e tratamentos, e implementação de medidas de saúde pública para controlar a propagação. A produção de vacinas contra a COVID-19 representou um marco na imunologia moderna. As vacinas de mRNA, como as da Pfizer-BioNTech e Moderna, utilizam uma tecnologia inovadora que instrui as células a produzir uma proteína do vírus, desencadeando uma resposta imune sem causar a doença.

2.4 ESQUISTOSSOMOSE E A IMUNOMODULAÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, de ocorrência tropical, sendo considerada endêmica em alguns estados do Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde (2014), 19 unidades federativas encontram-se em áreas endêmicas e focais que atingem os estados de Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Espírito Santo e Minas Gerais. Em Pernambuco, a esquistossomose é endêmica, está presente na zona rural da Zona da Mata com alcance em municípios do litoral do estado, sendo encontradas as formas clínicas agudas e graves e um número significativo de óbitos (BARBOSA et al., 2019).

A infecção é causada por parasitas da classe Trematódea e gênero *Schistosoma* que tem o homem como hospedeiro definitivo. No Brasil a única espécie encontrada é o *S. mansoni* (PORDEUS et al., 2008). No hospedeiro vertebrado, o parasita é encontrado na fase adulta na luz dos vasos, preferencialmente do plexo mesentérico e suas ramificações, principalmente na mesentérica inferior onde os vermes fêmeas realizam a

oviposição, liberando em média 400 ovos por dia. Após a oviposição, os ovos podem retornar pela veia porta e se alojar no tecido hepático ou transpor o tecido intestinal. O período desde a liberação dos ovos até o momento de atingirem a luz intestinal é de aproximadamente 20 dias. Os ovos, na fase inicial, apresentam-se embrionados e demoram, em média, sete dias para tornarem-se maduros, quando ocorre o rompimento da mucosa intestinal e os ovos são eliminados juntamente com as fezes. Os ovos que não são liberados alojam-se no tecido hepático e desenvolvem uma resposta imunológica no hospedeiro, que representa um fator importante na sua patogênese (NEVES et al., 2007; REY, 2010; SOUZA et al., 2011; ABATH et al., 2006).

Em contato com coleções hídricas, os ovos liberam o miracídio, que se locomove para encontrar o hospedeiro invertebrado *Biomphalaria glabrata* ou *B. straminea*. Penetrando no molusco, os miracídios sofrem divisões, num período de 30 a 35 dias, até se transformarem em cercárias, que serão liberadas por um longo período de tempo. No meio líquido, em condições ideais de temperatura, luminosidade e oxigenação, as cercárias são liberadas e penetram no hospedeiro definitivo por meio cutâneo ou ingestão acidental. No indivíduo, as cercárias se transformam em esquistossômulos, que, após migrarem pelo tecido subcutâneo, chegam aos pulmões através do sistema circulatório. Por meio do coração direito, os esquistossômulos voltam do pulmão ao coração e são levados pela circulação até o sistema porta-hepático onde se diferenciam sexualmente. Esse processo, desde a infecção com a cercária até a liberação dos ovos nas fezes, dura cerca de 45 dias. Durante a reprodução, as fêmeas se alojam no canal ginecóforo presente no macho e após a fecundação migram para as vênulas até alcançarem as veias mesentéricas e começarem a oviposição (NEVES et al., 2007; REY, 2010; SOUZA et al., 2011; ABATH et al., 2006).

A imunomodulação é uma tática empregada pelos parasitas para invadir com sucesso dos seus hospedeiros humanos, assim aplicando várias estratégias imunomoduladoras para evitar a detecção imunológica, suprimindo a imunidade celular e evitando ataques imunológicos do hospedeiro. Isso inclui a produção de moléculas imunomoduladoras, alteração das membranas e a promoção da formação de granuloma (ALLEN JE, MAIZELS RM, 2011). Doze horas após a penetração das cercárias, observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica capaz de destruir importante quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele, esta é a primeira “linha de defesa” (SOUZA, 2011). Durante a passagem pela epiderme e derme, ocorre

se acredita bloquear certas quimiocinas para facilitar a formação do granuloma e alterar a celularidade do granuloma (SMITH P, FALLON RE et al., 2005).

Os granulomas intestinais têm a capacidade de sair para o lúmen intestinal enquanto que os ovos do granuloma hepático permanecem presos, as secreções dos ovos presos são conhecidas por estimular as células T CD4 + inicialmente a liberar as citocinas IL-2 e IFN- γ do tipo Th1 no qual essa resposta muda gradualmente para uma resposta Th2 produzindo IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13 (PEARCE EJ, MACDONALD AS, 2002). As células T CD4 + geralmente ditam a resposta granulomatosa aos ovos, outras células como a T CD8 +, células B, macrófagos M2 e eosinófilos também são importantes na regulação da formação de granuloma. (HERBERT DR, 2004) Embora a formação de granulomas seja considerada um mecanismo de proteção para evitar danos excessivos ao tecido do hospedeiro, a resolução do tecido granulomatoso pode causar fibrose tecidual considerável, particularmente em casos de infecções repetidas e crônicas (FAIRFAX K et al., 2012)

As células T regulatórias têm sido identificadas como células secretoras de IL-10 e TGF- β (ARAUJO et al., 2008). Estas células estão envolvidas na imunossupressão durante a esquistossomose e têm sido relacionadas com o controle da patogenia da doença (BURKE et al., 2009; WAKKACH et al., 2003). Alguns autores observaram a função da IL-10, na regulação de ambos os perfis de resposta Th1 e Th2. De fato, estudos sobre os mecanismos de modulação do granuloma, em modelos murinos, demonstraram que animais IL-10 -/- (geneticamente deficiente da produção de IL-10) desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, havendo aumento de IFN- γ /IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4 (WYNN et al., 1997).

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora importante na proteção do hospedeiro contra uma imunopatologia associada à infecção. Sua produção é associada a resposta de células Treg, mas sabe-se que uma grande variedade de células tanto da imunidade inata quanto da adaptativa podem expressar IL-10, incluindo macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e mastócitos (NG et al., 2013).

Um estudo realizado com 751 indivíduos mostrou que a proporção de COVID-19 grave ou crítico foi significativamente maior em pacientes sem co-infecção parasitária. A proporção de COVID-19 grave em pacientes sem parasitas (196/467 [42,0%, CI 37.5646.52]) foi significativamente maior do que naqueles com parasitas (22/284 [7,8%, CI 5.1411,51]); $p < 0,0001$. Da mesma forma, a proporção de COVID-19 crítico em pacientes sem qualquer infecção parasitária (32/467 [6,9%, CI:4.889,54]) foi

significativamente maior do que naqueles co-infectados com parasitas (5/284 [1,8, CI 0,734 0,18]; $p < 0,0001$) Os possuíam coinfeções de parasitas como *Entamoeba* spp., *Hymenolopis nana* e *S. mansoni* (ADEME M e et al, 2021).

A interação co-infecção por COVID-19 e helmintos pode ser um fenômeno comum em países de baixa e média renda, contudo ainda não compreendido o suficiente. Conseqüentemente, a relação entre a infecção por *S. mansoni* e COVID-19, especificamente, ainda é pouco conhecida. Bradbury et al., 2020 observou que o envolvimento das respostas do tipo 2 na imunopatologia da SARS e COVID-19 (que tem a resposta imune tipo 1 como protetora (HU, HUANG, YIN, 2020)) seria preocupante ao considerar os possíveis efeitos da coinfeção por helmintos, e portanto, sugeriu a comunidade de pesquisa a investigar a influência da coinfeção por helmintos nos resultados do COVID-19, visto que segundo um estudo a imunomodulação destes parasitas pode causar uma ineficácia das vacinas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou seja, que apresentam idade avançada, comorbidades e/ou gestantes, prejudicando, assim, a imunização da população. (ABDOLI, A. 2020)

2.6 VACINA BCG E SEU EFEITO IMUNOMODULADOR

Identificado pelo sobrenome de seus desenvolvedores, Albert Calmette e Camille Guerin, o imunizante envolvido no enredo desta pesquisa, Bacilo Calmette Guerin (BCG), após mais de 13 anos e 231 tentativas até alcançar sua fórmula final, teve sua primeira aplicação datada de 1921 em Paris na França (PEREIRA et al., 2007). No Brasil, tendo sido utilizado inicialmente via oral em 1927, passou a compor o calendário nacional de imunização estabelecido pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) em 1977, tornando-se obrigatória sua administração, que se dá por via intradérmica, em dose única, indicada a partir do nascimento até antes de a criança atingir os 5 anos de idade. (DATASUS).

O imunobiológico caracteriza-se por elaboração a partir de bactéria atenuada de origem bovina - *Mycobacterium bovis* - sendo capaz de prevenir formas graves da tuberculose. Além disso, contém a propriedade de imunomodulação heteróloga, ou seja, às condições causadas por outros patógenos não relacionados à tuberculose, por induzir memória inata via macrófagos alterando a ativação linfocitária. (GUPTA, 2020).

Em relação à imunidade inata, após a injeção intradérmica da vacina por BCG, dar-se o início de uma resposta imune com o reconhecimento de antígenos do BCG onde

neutrófilos residentes, macrófagos e células dendríticas (DCs) interagem com o bacilo. O reconhecimento ocorre por meio da interação de diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como peptidoglicano, arabinogalactana e ácidos micólicos localizados na parede celular da bactéria (COVIAN, C. e et al, 2019). Um dos antígenos presentes na parede celular do BCG corresponde ao antígeno (Ag) 85 (também presente no *M. tuberculosis*), que estimula a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1-beta (IL-1 β) e IL-6, que são capazes de gerar um estado pró-inflamatório que promove a ativação de células imunes (TSUJI, S. 2000).

Com relação à imunidade treinada, em um modelo *in vitro* foi demonstrado que monócitos estimulados com o bacilo Calmette Guerin (BCG) mostraram respostas aumentadas de citocinas pró e anti-inflamatórias na re-estimulação com estímulos não relacionados (LPS ou o Pam3Cys) (BEKKERING et al., 2016). Estudos epidemiológicos em países onde o BCG é administrado a neonatos revelaram que a vacina BCG reduz a mortalidade neonatal e infantil independente de seu efeito sobre a tuberculose. A redução da mortalidade por BCG parece ser devido à indução de proteção contra agentes infecciosos não relacionados, como os patógenos que causam sepse neonatal ou infecções graves do trato respiratório. A base imunológica desses efeitos inespecíficos foi encontrada no sistema imune inato, liberando citocinas ao reconhecer componentes de microrganismos (GYSSSENS et al., 2019). Sendo assim, além de sua eficácia contra a tuberculose, a vacina BCG tem demonstrado efeitos moduladores no sistema imunológico que vão além de sua proteção específica contra a TB (BREWER TF, 1995). Estudos epidemiológicos sugeriram que a vacina BCG pode fornecer proteção contra infecções respiratórias, incluindo assistência viral, como influenza (gripe) (LEENTJENS J, e et al, 2015)

A vacinação com BCG em indivíduos saudáveis induz a reprogramação epigenética dos monócitos, fornecendo proteção contra patógenos não relacionados por até 3 meses após a vacinação. Conseqüentemente, isso demonstra a capacidade das células imunes inatas (IICs) de montar uma resposta não específica do tipo 'memória' (BARRETO et al, 2006). Um acompanhamento de 60 anos de um ensaio clínico relatou uma redução significativa no desenvolvimento de câncer de pulmão em adultos que receberam a vacinação BCG na primeira infância (USHER e et al, 2019). Além disso, a vacinação com BCG pode alterar o fenótipo de monócitos que secretam maior quantidade

de citocinas, como TNF- α , IFN- γ e IL-1, quando expostos a patógenos não micobacterianos. A imunização com a vacina BCG protege contra vários vírus, como o vírus vaccinia e o vírus herpes simplex tipo 2 (STARR, 1976). Os efeitos protetores do BCG foram demonstrados contra a influenza A na redução dos títulos virais, juntamente com a redução da inflamação e da lesão pulmonar (STARR, 1976). Um aumento significativo de anticorpos inespecíficos, soroconversão aprimorada contra o vírus H1N1 e fagocitose aumentada de patógenos transportados pelo ar e células T de memória nos pulmões sugerem o papel protetor da vacina BCG contra patógenos não relacionados (LEENTJENS J e et al, 2015). Aumentar as respostas imunes inatas por BCG para controlar a replicação viral na fase inicial da infecção pode ser uma boa abordagem. Com isso, possuindo proteção contra outras doenças, foi sugerida a sua aplicação como reforço na vacinação contra a COVID-19 (DOS ANJOS et al., 2022)

O efeito imunomodulador da BCG refere-se à sua capacidade de influenciar o sistema imunológico de maneira a proporcionar proteção contra outras doenças, além da tuberculose. Isso ocorre porque a BCG ativa células imunológicas, como os macrófagos e os linfócitos T, que desempenham um papel crucial na defesa contra infecções. Estudos têm demonstrado que a vacina BCG pode oferecer proteção contra outras doenças infecciosas, como a malária, a leishmaniose e até mesmo contra algumas formas de câncer. Além disso, a BCG também tem sido associada a uma redução na incidência de doenças alérgicas e autoimunes, como asma e doença de Crohn. O mecanismo pelo qual a BCG exerce seu efeito imunomodulador envolve a ativação de células dendríticas, que apresentam antígenos às células T, desencadeando uma resposta imune. Além disso, a BCG também induz a produção de citocinas, moléculas que regulam a resposta imune. Podendo modular também na resposta ao COVID-19. (CUNHA, D. V., 2022)

OBJETIVOS

GERAL

Verificar se existe diferença entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias tipo 1 e tipo 2, bem como do perfil regulatório em culturas de monócitos, previamente estimulados com BCG, de pacientes sensibilizados por *S. mansoni* quando comparados com não sensibilizados, vacinados por BCG, em resposta imune inata ao SARS-Cov-2

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias tipo 1 (IL-6; TNF- α), tipo 2 (CCL5) e do perfil regulatório (IL-10) após estímulo do BCG, seguido de estímulo com SARS-Cov-2 em indivíduos IgG positivos e IgG negativo para SEA/SWAP;
- Comparar os níveis de citocinas e quimiocinas em indivíduos com anticorpos IgG positivo para *S. mansoni* e indivíduos sem anticorpos IgG para *S. mansoni*, após estímulo BCG, seguido de estímulo com SARS-Cov-2

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE), CAAE: 38508620.9.0000.5208 (Anexo 2). A realização da presente pesquisa obedeceu aos preceitos éticos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal em que tivemos grupos de comparação formados por indivíduos selecionados através de um questionário. Os grupos estudados se constituíram em grupo “1” que representa os IgG positivos para SEA/SWAP e grupo “2” IgG negativos para SEA/SWAP. Foi coletado o sangue periférico desses indivíduos para a estimulação em cultura de monócitos (*in vitro*) e avaliação da resposta frente a BCG e ao SARS-CoV-2.

4.3 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no município de Escada, situado na Zona da Mata de Pernambuco, a aproximadamente 63 km de Recife e 63.517 habitantes. O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de Escada é de 0,632). 67,8% dos domicílios de Escada não possuem saneamento básico adequado e 18,7% dos domicílios não são abastecidos pela rede geral de abastecimento de água (IBGE, 2010). O município apresenta clima tropical chuvoso, com verão seco (IBGE, 2010) e um histórico de infecções para esquistossomose. Para o grupo controle foram selecionados indivíduos da cidade de Recife-PE, por ser uma região de baixa endemicidade. Recife, capital de Pernambuco, é uma cidade próspera, conforme demonstram os números mais recentes. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população estimada do Recife em 2024 é de 1.587.707 pessoas, solidificando sua posição como uma das principais cidades do país. Em 2022, ocupava a nona posição entre as cidades mais populosas do Brasil e a terceira do Nordeste, reforçando seu papel central na região. Em 2024, o Recife alcançou outro marco significativo, ao se posicionar como a segunda capital brasileira mais bem avaliada no Índice de Gestão Pública (ITGP), com uma nota impressionante de 80,1/100 pontos. Essas diferenças refletem disparidades econômicas e sociais entre as duas cidades. Recife, como capital do estado de Pernambuco, tende a concentrar mais recursos econômicos,

educacionais e de saúde, o que contribui para seu maior IDH. Já Escada, embora tenha um IDH considerado médio, ainda enfrenta desafios no que diz respeito à educação e renda.

4.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Indivíduos adultos, de ambos os sexos, de 18 a 59 anos de idade, oriundos da cidade de Escada-PE, e indivíduos residentes da cidade do Recife-PE. Foram selecionados através de amostra por conveniência totalizando 13 pacientes onde através do questionário aplicado, os indivíduos foram divididos em Grupo “1” – indivíduo com anticorpos IgG anti-SEA/SWAP positivos (sensibilização por *S. mansoni*) e grupo “2” indivíduo com anticorpo negativo para IgG anti-SEA/SWAP e todos vacinados com BCG.

Os critérios de inclusão foram: indivíduos entre 18 a 59 anos de idade, ambos os sexos, residentes na cidade de Escada-PE e na cidade de Recife-PE, onde apresentaram parasitológico de fezes negativo para qualquer helminto e/ou protozoário e foram sorologicamente positivo para IgG anti-SEA/SWAP (Grupo 1) ou sorologicamente negativo para IgG anti- SEA/SWAP (Grupo 2). Indivíduos com marcas da vacina do BCG foram incluídos neste estudo.

Os critérios de exclusão foram: indivíduos com doenças respiratórias (hipertrofia adenoideanas, insuficiência respiratória crônica causada por: fungos, bactérias e vírus) no qual foram avaliados por meio do questionário, bem como indivíduos com Covid-19 no momento do recrutamento. Pacientes que não apresentaram a marca da vacinação por BCG.

4.5 RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES E INSTRUMENTOS PARA COLETA DOS DADOS

Os indivíduos selecionados no estudo assinaram o Termo de Consentimento livre esclarecido, responderam o questionário (Apêndice I). Os indivíduos sensibilizados com *S. mansoni* foram selecionados em parceria com o SANAR. Após a coleta de sangue e a análise do soro por Elisa, os indivíduos selecionados formaram 2 grupos de comparação: Grupo 1, os sensibilizados por SEASWAP-BCG e o grupo 2, os Não sensibilizados por

SEASWAP-BCG sendo, posteriormente os monócitos cultivados e re-estimulados com BCG seguido de estímulo com SARS-Cov-2.

4.6 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados 18mL de sangue venoso em tubos com heparina sódica para utilização nos ensaios de cultura celular. O isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foi realizado por diluição de sangue em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril e centrifugação de densidade em Ficoll-Paque (GE Healthcare, UK). O isolamento de monócitos por Percoll foi realizado segundo Bekkering et al., 2016. A camada de interface foi isolada e as células foram lavadas com PBS frio. As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI modificado (Invitrogen, CA, EUA) suplementado com 10 µg/ml de gentamicina, 10mM de GlutaMAX e 10 mM de piruvato e contadas. Uma etapa de purificação extra foi adicionada permitindo que monócitos isolados com Percoll possam aderir às placas de poliestireno de fundo plano (Corning, NY, EUA) por 1h a 37°C.

4.7 CULTURA DE MONÓCITO E ESTÍMULO POR BCG E SARS-CoV-2

O modelo de imunidade treinada usado foi descrito por Bekkering et al., 2016. Os monócitos (100.000 células/poço) foram adicionados na placa de 96 poços de fundo plano. Após incubação por 1h a 37°C e lavagem com PBS quente, os monócitos foram incubados por 24h com meio de cultura ou este adicionado de 10 µg/ml de BCG (24 horas; 1º estímulo), o sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C e logo após foi feita a lavagem e repouso de 24h, o sobrenadante da cultura foi coletado e armazenado a -80°C. Em seguida foi adicionado meio de cultura, onde as células ficaram em repouso por 3 dias. Após esse período foi retirado o meio de cultura e feito o 2º estímulo com SARS-Cov-2 (1 µg/ml) em que os monócitos ficaram incubados por 24h. Após a incubação, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80°C.

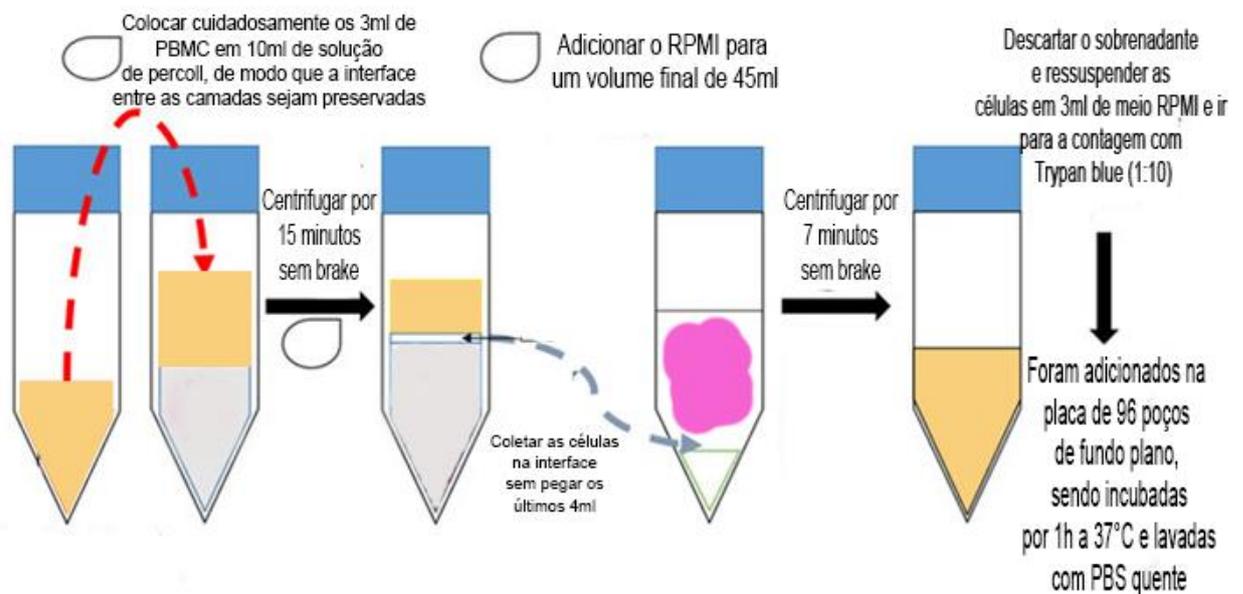
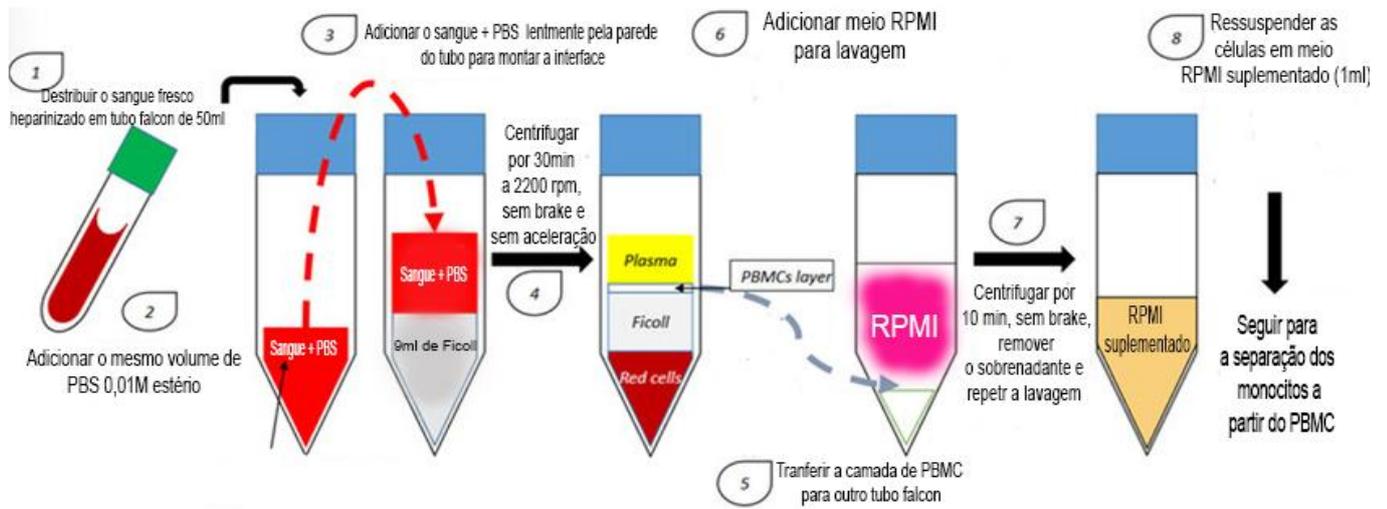


Figura 3: Etapas de purificação e cultura de monócitos sob estímulo de BCG e SARS-COV-2

4.8 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS DA ESQUISTOSSOMOSE

Os antígenos do *S. mansoni* já foram preparados previamente, seguindo o protocolo a seguir. Esse protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz (CEUA-113/2017). Resumidamente, camundongos *Swiss webster* foram infectados por via cutânea com aproximadamente 150 cercárias de *S. mansoni*. Os vermes obtidos da perfusão foram separados em machos e fêmeas. Os vermes machos foram macerados manualmente com bastão de vidro na presença de Tampão fisiológico TRIS-CHAPS e todo o material foi ultrassonicado em três ciclos de 20 pulsos, sendo cada pulso de 60 segundos a uma potência de 25W (Processador Ultrassônico 500 Watts, Cole Parmer: modelo 501). O material permaneceu overnight a 4°C para a extração de proteínas solúveis em NaCl, foi ultracentrifugado a 104 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante submetido à nova ultracentrifugação a 105 x g por 1 hora a 4°C.

Os fígados dos camundongos perfundidos foram cortados e embebidos em solução salina (NaCl) a 1,7% por 24 horas a 4°C. Após esse período, foram aquecidos a 37°C sob agitação em banho-maria durante 2 horas. Posteriormente, os fígados foram triturados e a suspensão filtrada em malha de 180µm e 130µm. O material filtrado passou por um processo de decantação e em seguida foi centrifugado, em tubos siliconizados a 200 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 1,7% e passou por maceração manual com bastão de vidro na presença de inibidor de protease (composta por EDTA, metanol e PMSF) e foi ultrassonicado em três ciclos de 20 pulsos, sendo cada pulso de 60 segundos a uma potência de 25W (Processador Ultrassônico 500 Watts, Cole Parmer: modelo 501). O material foi ultracentrifugado a 104 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante submetido à nova ultracentrifugação a 105 x g por 1 hora a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi dialisado contra água deionizada, utilizando-se membrana de celulose para diálise, com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno.

As proteínas dos antígenos foram dosadas através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) e corados pelo Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970).

4.9 DOSAGEM DE IgG ANTI-SEA E ANTI-SWAP PARA CONFIRMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram coletados sangue total de 13 pacientes, visto que os 7 que foram de região não-endêmica, positivaram para o antígeno do *S. Mansoni* para obtenção do soro/plasma. Placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas por 3 horas, a 25°C, com 20µg/mL de antígeno solúvel dos ovos (SEA) e do verme adulto (SWAP) do *S. mansoni* diluídos em tampão carbonato bicarbonato. Após lavagem com PBS-T (PBS 0,01M acrescido de 0,05% de Tween 20), as placas foram bloqueadas com 100µL/poço de PBS 0,01M contendo 3% de leite (PBS-Leite) “overnight” a 4°C. Um novo ciclo de lavagens foi realizado e foram adicionados os soros dos pacientes, diluídos 1:10 em PBS 0,01M. Após 1h de incubação a 37°C e lavagem, foi adicionada a anti-IgG humana biotinizada (555785 -BD Pharmingen), diluído 1:6000 em PBS-Leite. Após incubação de 1h a 37°C, nova lavagem com PBS-T (3x) foi realizada e foi adicionada a Streptoavidina peroxidase (RPN 4401V-GE Healthcare), diluída 1:8000 em PBS-Leite. Foi adicionado o tampão revelador (OPD (Ortho-phenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvido em tampão tris-citrato 0,1M (pH 5,5) e H₂O₂ 30%). As placas foram lidas em leitor de ELISA (492 nm) para o cálculo da densidade óptica (DO). Os pacientes foram categorizados como positivo e negativo com base na razão entre as D.O. das amostras e o ponto de corte (média de 3 soros controles sabidamente negativos=0,2). Os resultados da razão maior que 1,5 foram considerados positivos.

4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS

Os sobrenadantes das culturas dos monócitos foram armazenados a -80°C e descongelados para detecção das citocinas pró-inflamatórias tipo 1 (IL-6; TNF- α), Th2/Treg (CCL5), perfil regulatório (IL-10) pela técnica do “Cytometric Bead Array” (CBA) usando a metodologia flex (BD Biociences), é uma técnica utilizada para a detecção e quantificação simultânea de múltiplos analitos, como proteínas, citocinas ou anticorpos, em uma única amostra, a técnica combina a sensibilidade da citometria de fluxo com a flexibilidade de um ensaio baseado em esferas (beads), permitindo a análise multiplexada de diferentes moléculas em um único experimento. O princípio da técnica baseia-se no uso de pequenas esferas fluorescentes (beads) que são revestidas com anticorpos específicos para os analitos de interesse. Essas esferas são codificadas com

diferentes intensidades ou combinações de fluorocromos, permitindo que cada população de esferas seja identificada individualmente pela citometria de fluxo. A amostra contendo os analitos de interesse é incubada com as esferas, e qualquer analito presente se liga ao anticorpo específico na superfície da bead (Luminex Corporation, 2006).

Os kits utilizam microbeads fluorescentes com anticorpos de detecção e de captura para a quantificação das citocinas ou quimiocinas em 25µl de amostra e a leitura é feita no citômetro de fluxo. Os resultados serão expressos em µg/ml, de acordo com curva padrão.

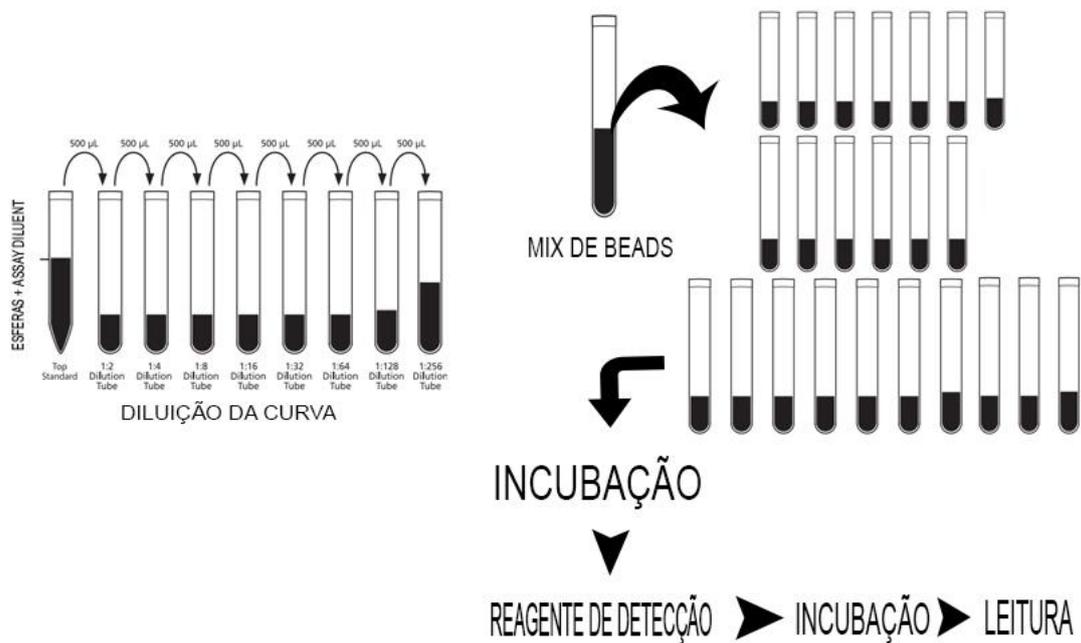
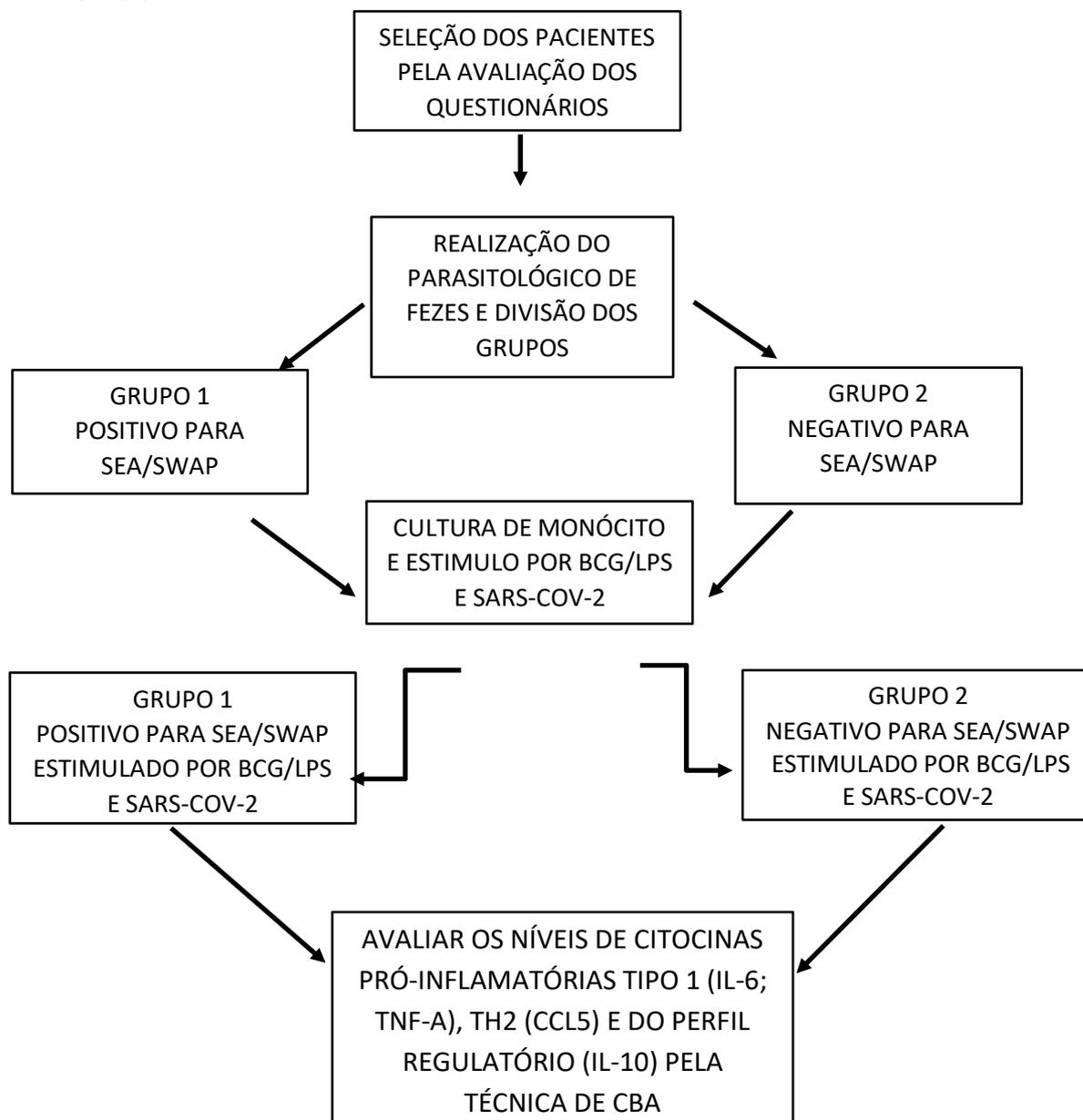


Figura 4: técnica do “Cytometric Bead Array” (CBA)

4.11 FLUXOGRAMA



4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Níveis de citocinas e quimiocinas nos grupos [1] positivo para IgG SEA/SWAP e [2] Negativo para SEA/SWAP, foram comparados usando o teste de Kruskal Wallis e a comparação Múltipla através do teste de Dunn. Dentro todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Foram selecionados pacientes de ambos os sexos, com idades entre 18 e 59 anos, provenientes de regiões distintas para composição dos grupos de estudo. A primeira região apresentava alta endemicidade para *S. mansoni*, constituindo o grupo controle positivo, enquanto a segunda região apresentava baixa endemicidade do helminto, formando o grupo controle negativo. Para a determinação desses grupos, foi realizada a dosagem de anticorpos IgG anti-sea/swap. Os resultados revelaram que 69,23% (n=9) dos pacientes apresentaram resultados positivos, enquanto 30,77% (n=4) foram negativos. No grupo positivo, 44,4% (n=4) eram do sexo masculino e 55,6% (n=5) do sexo feminino, com uma média de idade de 37,11 anos. Já no grupo negativo, 25% (n=1) era do sexo masculino e 75% (n=3) do sexo feminino, com uma média de idade de 31,25 anos.

Tabela 1: Caracterização da população de estudo quanto ao gênero, infecção com Sars-Cov-2, vacinação (doses) para Covid-19 e positividade IgG anti-SEA/SWAP

	IgG+ para SEA/SWAP n= 9(69,23%)	IgG- para SEA/SWAP n=4(30,77%)
Gênero		
Masculino	4 (44,4%)	1 (25%)
Feminino	5 (55,5%)	3 (75%)
Idade (mediana ± erro padrão)	37,11 ± 4,14	31,25 ± 4,14
Covid-19		
Tiveram	3 (33,3%)	2 (50%)
Não tiveram	6 (66,6%)	2 (50%)
Vacina Covid-19		
1º dose	9 (100%)	4 (100%)
2º dose	9 (100%)	4 (100%)
3º dose	8 (88,8%)	1 (25%)
4º dose	2 (22,2%)	0 (0%)

Trabalhos científicos, embora busquem objetividade e precisão, podem estar sujeitos a vieses que influenciam seus resultados e conclusões. Para diminuir os vieses, observamos também quanto à infecção pelo SARS-CoV-2 e à vacinação contra o vírus. No grupo positivo para IgG anti-SEA, 3 pacientes apresentaram resultados positivos para infecção por SARS-CoV-2, confirmados por testes rápidos durante o período de infecção. Outros 6 pacientes relataram não ter apresentado sintomas sugestivos de infecção, embora apenas 3 tenham realizado testes de confirmação durante o período de suspeita. No grupo negativo, 2 pacientes apresentaram resultados positivos para SARS-CoV-2 e 2 apresentaram resultados negativos.

Não houve diferença estatística nos níveis de TNF- α entre os grupos IgG+ e IgG-. No cultivo basal (sem estímulo), ambos os grupos apresentaram produção basal de TNF- α , mas o grupo IgG+ apresentou níveis menores. Após estímulo com BCG, houve aumento na produção de TNF- α em ambos os grupos e o grupo IgG+ apresentou produção maior de TNF- α em comparação com o grupo IgG-. Após estímulo com SARS-CoV-2, os níveis de TNF- α foram baixos em ambos os grupos e não houve diferença significativa em relação ao estímulo prévio com BCG. Em resumo, o estímulo com BCG induz uma resposta imune mais forte no grupo IgG+ e o estímulo com SARS-CoV-2 não induz uma resposta imune significativa em nenhum dos grupos.

Na análise da IL-10, o estímulo com BCG induziu uma produção maior desta citocina em ambos os grupos (IgG+ e IgG-), em comparação com o cultivo basal, embora não tenha havido significância estatística. A estimulação com SARS-CoV-2, seja isoladamente ou após re-estimulação com BCG, resultou em menor produção de IL-10 em comparação com os demais estímulos.

Quanto os níveis da quimiocina CCL5, ao observar o grupo IgG+, foi visto uma maior expressão dessa quimiocina nos níveis basais, bem como no re-estímulo com BCG, quando comparado com os estímulos MEIO-SARS IgG+ e BCG-SARS IgG+. O mesmo foi observado no grupo IgG-, uma maior expressão dessa quimiocina nos níveis basais, bem como no re-estímulo com BCG.

Na análise da IL-6, observa-se a produção dessa citocina em níveis basais, bem como re-estimulado com BCG, sem diferença estatística quando comparadas, para ambos os grupos IgG+ e IgG-. Houve níveis significativamente menores de IL-6, no grupo IgG+, frente ao estímulo SARS-Cov-2 ou BCG-SARS-Cov-2, comparado ao contato prévio com MEIO e BCG. Contudo, no grupo IgG-, a produção de IL-6 sob os estímulos SARS-Cov-2 ou BCG-SARS-Cov-2 foi menor, porém sem diferença estatística, quando as

células foram cultivadas antes com MEIO e BCG. A produção de IL-6 pelas células do grupo MEIO-SARS-Cov-2 e BCG-SARS-Cov-2 no grupo IgG- foi maior, porém sem diferença estatística, quando comparado ao grupo IgG+.

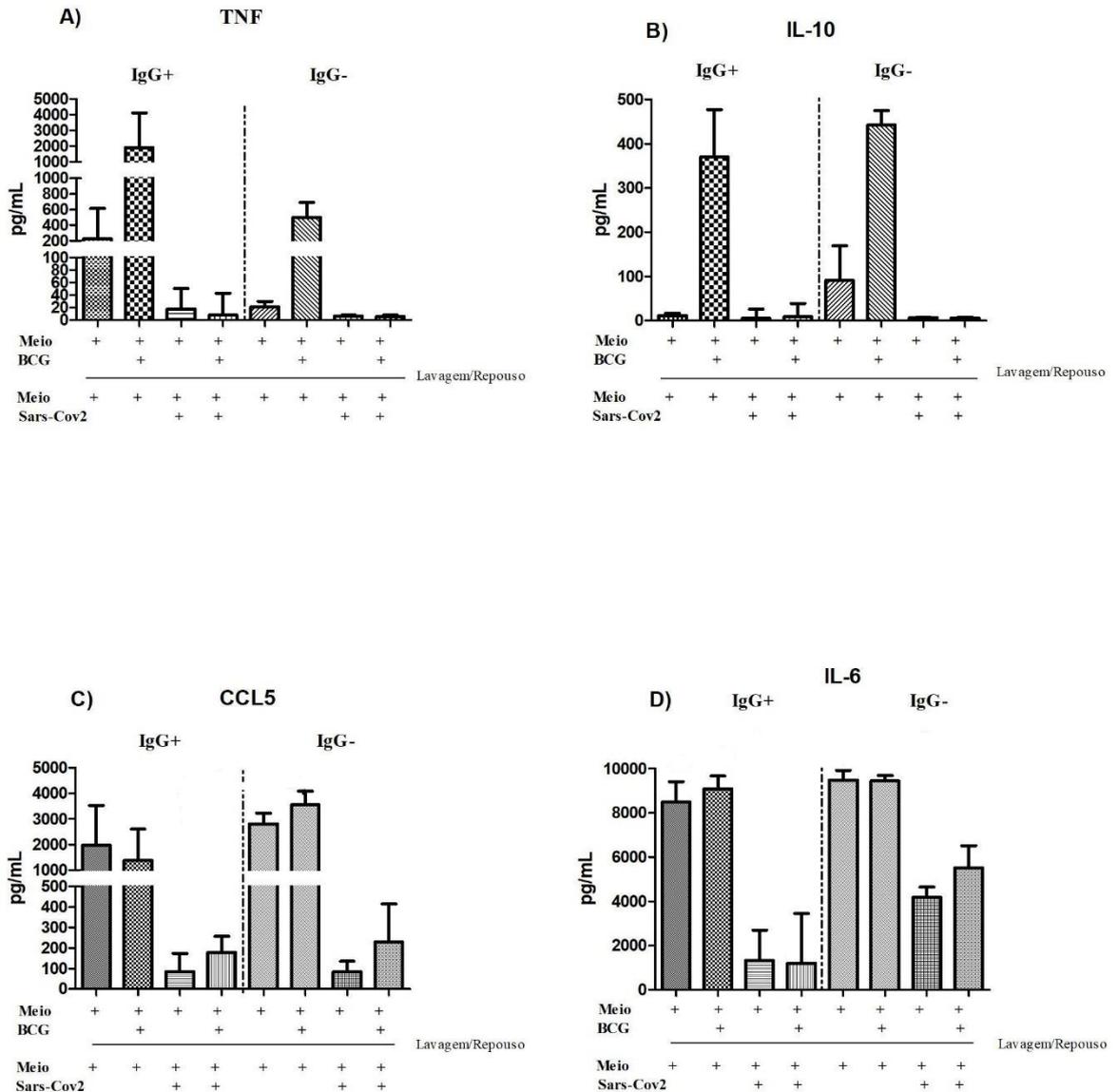


Figura 5: Níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e CCL5 em cultura de monócitos de indivíduos positivos para IgG anti-SEA/SWAP (IgG+) e de indivíduos negativos (IgG-). Os monócitos foram cultivados (24hs) apenas meio de cultivo ou junto com SEA (20 ng/mL) (1° estímulo). Após lavagem e 3 dias de repouso, foi adicionado o 2° estímulo SARS-CoV-2 (1 ng/mL) por 24 horas. As citocinas foram dosadas por CBA.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado a influência do contato prévio com BCG na resposta imune mediada por monócito ao SARS-COV-2 nos indivíduos sensibilizados pelo *S. mansoni* quando comparados com não sensibilizado, vacinados por BCG, observando a diferença entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias Th1 (IL-6; TNF- α), Th2 (CCL5) e do perfil regulatório (IL-10) em culturas de monócitos desses indivíduos. Neste cenário, foi possível observar que a vacinação por BCG induziu a produção de IL-10 e TNF, sendo esta última maior em indivíduos sensibilizado pelo *S. mansoni*, apesar disso não modificou a resposta ao SARS-CoV-2.

Diferentes pesquisas afirmam que as co-infecções helmínticas são responsáveis por um aumento considerável na morbimortalidade de doenças graves, como AIDS, malária e tuberculose. Partindo dessa observação, foi sugerido que os helmintos também podem ser responsáveis por modificar o curso da COVID-19 (ABDOLI e et al, 2020). Além disso, segundo os autores, a imunomodulação a estes parasitas pode causar uma ineficácia das vacinas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou seja, que apresentam idade avançada, comorbidades e/ou gestantes, prejudicando, assim, a imunização da população. Por outro lado, a esquistossomose induz linfócitos T regulatórios que podem controlar a reação inflamatória anti-SARS-CoV2 e aumentar o número de células de memória circulantes (CARVALHO e et al, 2008)

Como esperado houve produção de TNF em resposta ao BCG, visto que todos os indivíduos estavam vacinados com BCG, caracterizando a imunidade treinada homóloga. A produção de TNF tanto em paciente IgG+ e IgG-, condiz com a estimulação do BCG no sistema imunológico, desencadeando uma resposta imune, principalmente a resposta tipo celular. Esta resposta inclui a ativação de células como os macrófagos, que desempenham um papel crucial na defesa do organismo contra infecções bacterianas (TSUJI, S. 2000). De fato, a imunidade treinada homóloga pode alterar o fenótipo de monócitos que secretam maior quantidade de citocinas, como TNF- α , IFN- γ e IL-1, quando expostos a patógenos não micobacterianos (STARR, 1976). É possível dizer que houve uma tendência de maior produção desta citocina nos indivíduos sensibilizados pelo *S. mansoni*. Henri e colaboradores (2002) relataram que a infecção por *S. mansoni* está associada com altos níveis de TNF- α . Um estudo onde foi avaliado a estimulação de

hemoculturas sob ativação policlonal (mitógeno) para conhecer a resposta imune celular mais ampla e de fundo (produção de citocinas e quimiocinas) dos indivíduos de áreas endêmicas para *S. mansoni*, sugeriu que indivíduos somente quando alérgicos e infectados (simultaneamente) apresentaram um perfil de resposta imune mista com níveis mais altos de TNF- α , IL-6, IFN- γ (resposta Th1) e IL-10 (citocina Th2/Treg), onde devido à infecção, houve aumento na produção de IL-6 e CXCL8 e menos CCL2 (NÓBREGA et al, 2021)

A produção de IL-10 foi também observada frente a re-estimulação com BCG, esse fato pode indicar uma regulação negativa da produção de TNF- α e controle da intensidade da reação inflamatória. Em muitos casos, a inflamação é necessária para combater infecções, mas ela também pode causar danos ao tecido circundante. A IL-10 limita a resposta a inflamatória excessiva que pode ser prejudicial ao hospedeiro. Portanto, a indução da IL-10 pelo BCG pode contribuir para regular a resposta imune, promovendo um equilíbrio entre a defesa eficaz contra a infecção e a prevenção de danos ao tecido. (TSUJI, S. 2000). As células T regulatórias têm sido identificadas como células secretoras de IL-10 e TGF- β (ARAÚJO et al., 2008). Estas células estão envolvidas na imunossupressão durante a esquistossomose e têm sido relacionadas com o controle da patogenia da doença (BURKE et al., 2009; WAKKACH et al., 2003). No nosso estudo a produção de IL-10 frente a estimulação com SARS-Cov2, com meio e re-estimulação com BCG, foi menor quando comparado aos demais estímulos.

A CCL5 é uma quimiocina envolvida no recrutamento de células imunes, como células T, macrófagos e eosinófilos, para os locais de inflamação. Estudos indicam que o BCG pode influenciar a expressão de várias citocinas e quimiocinas, incluindo a CCL5, no hospedeiro (MENDEZ, et al, 2008). Em nosso estudo, os níveis de CCL5 basais foram elevados em ambos os grupos, sensibilizados ou não para o *S. mansoni*, e não houve alteração em resposta ao BCG, indicando uma resposta inespecífica e independente ao contato com prévio com o helminto. No entanto, a resposta ao segundo estímulo com SARS-CoV-2 foi menor, independentemente da exposição prévia ao BCG. Então, a produção desta citocina não foi alterada em resposta ao SARS-CoV-2 e indica não ser uma quimiocina marcadora de memória treinada para os antígenos do *S. mansoni*.

Os níveis de IL-6 seguiram o mesmo curso da CCL5, níveis basais elevados nos grupos sensibilizados ou não para o *S. mansoni*, e sem alteração em resposta ao BCG, ou

seja, resposta inespecífica e presença de IgG anti-SEA/SWAP independente. No entanto, a resposta ao segundo estímulo com SARS-CoV-2 foi menor apenas nos indivíduos previamente infectados pelo *S. mansoni*, visto que os antígenos virais induziram produção consistente de IL-6 nos indivíduos negativos para IgG anti-SEA/SWAP. Para este resultado não foi requerido um segundo contato (*in vitro*) dos monócitos ao BCG (produção de IL-6 no MEIO/SARS-Cov-2). Contudo, não temos como afirmar se a produção foi devido à vacinação prévia com BCG ou com o SARS-CoV-2. Então, a produção desta citocina foi alterada em resposta ao SARS-CoV-2 e indica memória treinada pelo BCG ou pelo SARS-CoV-2. Para esta elucidação seriam necessários indivíduos não vacinados com BCG, mas por ser vacinação em massa desde o final da década 70, não encontramos tal perfil.

Além disso, nossos dados sugerem que o contato prévio com antígenos do *S. mansoni*, pode modular negativamente a produção de IL-6 pelos monócitos, em resposta ao SARS-CoV-2, mesmo em indivíduos re-estimulados com BCG. A expressão gênica de proteínas atuantes na epigenética no monócito e consequente síntese de moléculas imunorregulatórias merecem ser investigadas nos indivíduos com IgG anti-SEA/SWAP para elucidar a diminuição da IL-6 frente posterior estímulo viral.

Apesar do *n* amostral pequeno, os dados aqui apresentados sugerem que monócitos previamente sensibilizados com BCG podem atuar na imunidade treinada homóloga (re-estímulo BCG) e heteróloga (re-estímulo SARS-CoV-2), aumentando a produção de TNF e IL-6, respectivamente. Contudo, os dados sugerem que a prévia infecção com *S. mansoni* interfere de forma diferente na memória treinada aqui observada, aumentando a produção de TNF ao antígeno homólogo (BCG) e diminuindo à produção de IL-6 heteróloga (SARS-CoV-2)

CONCLUSÃO

Portanto sugere-se que a vacinação com BCG induz produção de IL-10 e TNF, sendo esta última maior em indivíduos sensibilizados pelo *S. mansoni*. A prévia infecção com *S. mansoni* interfere na memória treinada, aumentando a produção de TNF ao antígeno homólogo (BCG) e diminuindo a produção de IL-6 heteróloga (SARS-CoV-2). Então, o contato prévio com antígenos do *S. mansoni* pode modular negativamente a produção de IL-6 pelos monócitos em resposta ao SARS-CoV-2. A imunidade treinada homóloga (re-estímulo BCG) e heteróloga (re-estímulo SARS-CoV-2) pode ser influenciada pela vacinação com BCG e prévia infecção com *S. mansoni*, contudo a expressão gênica de proteínas atuantes na epigenética no monócito e consequente síntese de moléculas imunorregulatórias merecem ser investigadas. Sendo assim, os achados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e monitoramento, que levem em consideração a modulação imunológica por antígenos parasitários, porém ainda se faz necessário um estudo com o *n* amostral maior para confirmação dos resultados.

REFERÊNCIAS

ABATH, Frederico GC et al. Mecanismos imunopatogênicos na esquistossomose: o que pode ser aprendido com estudos em humanos?. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.

Abbas A, Lichtman A, Pillai S, Baker D, Baker A. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. p. 27-99, p. 138-209, p. 439-469.

ABBAS AK, Lichtman AH: **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Saunders 2003

Abdoli A. Helminths and COVID-19 Co-Infections: A Neglected Critical Challenge. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 3, n. 5, p. 1039-1041, 2020.

ACTOR, Jeffrey K. et al. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 12, p. 3050-3056, 1994.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALLEN, J., MAIZELS, R. Diversity and dialog in immunity to helminths. **Nat Ver Immunol** 11, 375–388 (2011). <https://doi.org/10.1038/nri2992>

ANEWAY JR, Charles A.; MEDZHITOV, Ruslan. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

AZKUR, A. K et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**. 2020 Jul;75(7):1564-1581

BARBOSA C. S.; LOYOR. M.; NASCIMENTOW. R. C. DO; GOMESE. C. DE S.; SILVAB. M. DA; SANTOSG. M. DOS; SILVAJ. A. M. da. Inquérito Malacológico em Localidades Endêmicas para Esquistossomose em Pernambuco, Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 14, p. e1235, 4 set. 2019

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nat Ver Immunol**, 8(3): 183-192, 2008.

BARRETO, Mauricio L.; PEREIRA, Susan M.; FERREIRA, Arlan A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. s45-s54, 2006

BEKKERING, S.; BLOK, B. A.; JOOSTEN, L. A.; RIKSEN, N. P.; et al. In Vitro Experimental Model of Trained Innate Immunity in Human Primary Monocytes [published correction appears in Clin Vaccine Immunol. 2017 May 5;24(5):]. **Clin Vaccine Immunol**. 2016;23(12):926-933.

BREWER TF, COLDITZ GA. Relationship between bacille Calmette-Guerin (BCG) strains and the efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. **Clin Infect Dis.** 1995;20:126-35.

BULUT, C.; KATO, Y. Epidemiology of COVID-19. **Turkish J Med Sciences.** v. 50, n. 1, p.563-570. 2020.

CHADHA KC, AMBRUS JL JR, DEMBINSKI W, AMBRUS JL SR. Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. **Exp Biol Med.** 2004; 229:285-90

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation : sensing and reacting to damage. **Nature Publishing Group,** v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010.

COVIAN, C. e et al. BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design Front. **Immunol.,** 29 November 2019 doi: 10.3389/fimmu.2019.02806

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia,** v. 50, p. 434-447, 2010.

DATASUS Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br>

DE OLIVEIRA NOBREGA, Cassia Giselle et al. A infecção por *Schistosoma mansoni* está associada à diminuição do risco de sintomas de alergia respiratória e baixa produção de CCL2. **Tropical Medicine & International Health ,** v. 26, n. 9, p. 1098-1109, 2021.

DE SORDI, Luiz Henrique Silva et al. O Papel da Imunidade Inata na COVID-19. **Health Sciences Journal,** v. 10, n. 3, p. 5-8, 2020.

EASTIN C, EASTIN T. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China: Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. **N Engl J Med.** 2020 Feb 28 [Online ahead of print] DOI: 10.1056/NEJMoa2002032. *J Emerg Med.* 2020 Apr;58(4):711–2. doi: 10.1016/j.jemermed.2020.04.004. Epub 2020 Jun 3. PMID: PMC7266766.

FAIRFAX K, NASCIMENTO M, HUANG SCC, EVERTS B, PEARCE EJ. Respostas Th2 na esquistossomose. *Semin Immunopathol.* 2012; 34: 863–871. pmid: 23139101

GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science,** v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GOUDOURIS, Ekaterini; ARANDA, Carolina Sanchez; SOLÉ, Dirceu. Implications of the non-specific effect induced by Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine on vaccine recommendations. **Jornal de Pediatria,** v. 99, p. S22-S27, 2023.

GUAN WJ, NI ZY, HU Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J Med.** 2020; 382(18): 1708-20. PubMed PMID: 32109013.

GUPTA, A., MADHAVAN, M.V., SEHGAL, K. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nat Med** 26, 1017–1032 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>

GYSENS, I. C.; NETEA, M. G. Heterologous effects of vaccination and trained immunity. **Clin Microbiol Infect.** 2019;25(12):1457-1458.

HAYS R et al. Helminth coinfection and COVID-19: An alternate hypothesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008628, 2020.

HENNESSY EJ, PARKER AE, O'NEILL LAJ. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature Rev Drug Discov.** 2010;9:293- 307.

HENRI, Sandrine et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 929-936, 2002.

HERBERT DR, HÖLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M, et al. A ativação de macrófagos alternativos é essencial para a sobrevivência durante a esquistossomose e modula negativamente as respostas do T helper 1 e a imunopatologia. **Imunidade.** (2004) 20: 623–35. doi: 10.1016 / S1074-7613 (04) 00107-4

HOGG KG, KUMBATE S, Anderson S, et al. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c β and F4/80 β cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infect Immun** 2003;71(6):3563-71

HU, BIYING; HUANG, SHAOYING; YIN, LIANGHONG. A tempestade de citocinas e a COVID-19. **Journal of medical virology** , v. 93, n. 1, p. 250-256, 2021.

HUANG, Chaolin et al. Características clínicas de pacientes infectados com o novo coronavírus de 2019 em Wuhan, China. **The lancet** , v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

JANSSEN, L; SANTOS, G. L. S; MULLER, H. S; VIEIRA, A. R. A; CAMPOS, T. A; MARTINS, V. P. Schistosome-Derived Molecules as Modulating Actors of the Immune

JANSSEN, Luis et al. Moléculas derivadas de esquistossomos como atores moduladores do sistema imunológico e candidatos promissores para tratar doenças autoimunes e inflamatórias. **Journal of immunology research** , v. 2016, n. 1, p. 5267485, 2016.

SSEBAMBULIDDE, Kenneth et al. Parasitas e sua proteção contra COVID-19-Ecologia ou Imunologia?. **MedRxiv** , p. 2020.05. 11.20098053, 2020.

SPEROTTO, Mariana Gazzoni. Impacto da vacinação prévia com bcg na resposta anti-spike igg em profissionais de saúde imunizados com diferentes vacinas contra covid-19. 2023.

KAMAL, S M et al. “Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4(+) T-cell and cytokine response.” **Gastroenterology** vol. 121,3 (2001): 646-56. doi:10.1053/gast.2001.27024

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs , RLRs and NLRs in pathogen recognition. **International Immunology**, v. 21, n. 4, p. 317–337, 2009.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Efeitos de longa duração da vacinação BCG nas respostas heterólogas Th1 / Th17 e na imunidade inata treinada . **J Innate Immun.** (2014) 6 : 152–8.

LEENTJENS J, KOX M, STOKMAN R, GERRETSEN J, DIAVATOPOULOS DA, VAN CREVEL R, RIMMELZWAAN GF, PICKKERS P, NETEA MG. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. **J Infect Dis.** 2015 Dec 15;212(12):1930-8. doi: 10.1093/infdis/jiv332. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26071565.

LI X, GENG M, PENG Y, MENG L, LU S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **J Pharm Anal.** 2020; 10(2): 102-8. PubMed PMID: 32282863s

MACDONALD A, ARAUJO MI, PEARCE EJ. Immunology of parasitic helminth infection. **Infect Immun.** 2002; 70:427-33

MACHADO, ARAÚJO, CARVALHO & CARVALHO. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004

MACHADO, Paulo RL et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647-662, 2004.

MANTOVANI, Alberto; SICA, Antonio; LOCATI, Massimo. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European journal of immunology**, v. 37, n. 1, p. 14-16, 2007.

MCGETTRICK AF, O'NEILL LAJ. Localisation and trafficking of Tolllike receptors: an important mode of regulation. **Curr Opin Immunol.** 2010;22(1):20-7.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MÉNDEZ-SAMPERIO, Patricia; TREJO, Artemisa; PÉREZ, Aline. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces CCL5 secretion via the Toll-like receptor 2-NF- κ B and-Jun N-terminal kinase signaling pathways. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 2, p. 277-283, 2008.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MURPHY, K. Alergia e doenças alérgicas. In: **Imunobiologia de Janeway. 8. ed.** Trad. Denise C. Machado e outros. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 571-582.

NAGY PD, POGANY J. Host Factors Promoting Viral RNA Replication. *Viral Genome Replication*. 2008 Nov 1:267–95. doi: 10.1007/b135974_14. PMID: PMC7120932. Heise MT. *Viral Pathogenesis. Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014:B978-0-12-801238-3.00079-9. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.00079-9. Epub 2014 Nov 28. PMID: PMC7157475.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. In: MELO, A.L., COELHO, P.M.Z., *Schistosoma mansoni* e a doença. **Atheneu**, São Paulo:13a ed., p. 193-212. 2007.

NG, T. H. et al. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Front Immunol**, v. 4, n. 129.10, p. 3389, 2013

NÓBREGA, Cassia Giselle de Oliveira et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with decreased risk of respiratory allergy symptoms and low production of CCL2. 2021.

O'NEILL LA, BOWIE AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**. 2007 May;7(5):353-64. doi: 10.1038/nri2079. PMID: 17457343.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Novo relatório de situação do Coronavírus (2019-nCoV) 2 [publicado online antes da impressão em 21 de janeiro de 2020]. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situationreports/20200122-sitrep-2-2019-ncov.pdf>

PALOMINO, Diana Carolina Torres; MARTI, Luciana Cavalheiro. Chemokines and immunity. **Einstein (são paulo)**, v. 13, p. 469-473, 2015.

Persaud AT, Bennett SA, Thaya L, Burnie J, Guzzo C. Human monocytes store and secrete preformed CCL5, independent of de novo protein synthesis. **J Leukoc Biol**. 2022 Mar;111(3):573-583. doi: 10.1002/JLB.3A0820-522RR. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34114669.

PORDEUS, Luciana Cavalcanti et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China, **Clinical Infectious Diseases**, Volume 71, Issue 15, 1 August 2020, Pages 762–768

RAJAMANICKAM, Anuradha et al. A infecção por helmintos modula citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias sistêmicas implicadas na patogênese do diabetes mellitus tipo 2. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008101, 2020.

REY, L. Bases da parasitologia médica. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 3a ed. p.171-182. 2010.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. Schistosoma "Eggs-Itting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 2492, 2018. ISSN 1664-3224 (Electronic) 1664-3224 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459767> >

SILVA LOP, NOGUEIRA JMR. Imunomodulação causada por parasitoses oportunistas em casos de COVID-19: um breve estudo. **Rbac**, v. 53, n. 2, p. 127-130, 2021.

SMITH, PHILIP et al. “*Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity.” **The Journal of experimental medicine** vol. 202,10 (2005): 1319-25. doi:10.1084/jem.20050955

SOTO, Jorge A. et al. BCG vaccination induces cross-protective immunity against pathogenic microorganisms. **Trends in Immunology**, v. 43, n. 4, p. 322-335, 2022.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clin. Med.** São Paulo, v. 9, p.300-7. 2011.

SSEBAMBULIDDE K et al. Parasites and their protection against COVID-19- Ecology or Immunology?. medRxiv, 2020.

STARR, Stuart E. et al. Effects of immunostimulants on resistance of newborn mice to herpes simplex type 2 infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 152, n. 1, p. 57-60, 1976.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TSUJI S, MATSUMOTO M, TAKEUCHI O, AKIRA S, AZUMA I, HAYASHI A, TOYOSHIMA K, SEYA T (2000) Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. **Infect Immun** 68:6883–6890

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24–S32, 2010.

USHER, Nicholas T. et al. Association of BCG vaccination in childhood with subsequent cancer diagnoses: a 60-year follow-up of a clinical trial. **JAMA network open**, v. 2, n. 9, p. e1912014-e1912014, 2019.

VADUGANATHAN M, VARDENY O, MICHEL T, MCMURRAY JJV, PFEFFER MA, SOLOMON SD. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor in patients with Covid-19. *N England J Med*. 2020; Epub ahead of print.

VASHISHTHA, V.M, 2020 Development of SARS-CoV-2 vaccines: challenges, risks, and the way forward. **Hum Vaccin Immunoth**. 021 Jun 3;17(6):1635-1649

VERSINI, Mathilde et al. Desvendando a hipótese higiênica de helmintos e autoimunidade: origens, fisiopatologia e aplicações clínicas. **Medicina BMC** , v. 1-16, 2015.

Wang C, Xie J, Zhao L, et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. **EBioMedicine**. 2020;57:102833. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833> PMID:32574956.
» <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>

WARDHANA, DATAU EA, SULTANA A, MANDANG VV, JIM E. The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly. **Acta Med Indones** 2011;43:185e90

WOLDAY D, GEBRECHERKOS T, AREFAINE ZG, et al. Effect of co-infection with intestinal parasites on COVID-19 severity: A prospective observational cohort study. **EClinicalMedicine**. 2021;39:101054. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101054

ZINDEL J, KUBES P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annu Rev Pathol**. 2020 Jan 24;15:493-518. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31675482.

ANEXOS

ANEXO I- Questionário

Formulário Nº _____ Data: ___/___/___
Nome: _____
Filiação _____
Endereço: _____ Tel. _____
Data de nascimento: ___/___/___ (checar cartão) Responsável pela entrevista: _____
Escolaridade Materna: Não estudou () 1º grau incompleto () 1º grau completo ()
2º grau incompleto () 2º grau completo () Superior ()
Renda Familiar: Meio salário mínimo () 1 salário mínimo () 1 a 2 salários mínimos ()
3 a 4 salários mínimos () 5 salários mínimos ou mais ()
História Familiar de Alergia: Mãe: Sim () Não ()
Pai: Sim () Não () Irmãos: Sim () Não ()
Tabagismo Passivo: Alguém fuma dentro de casa: Sim () Não ()
Aleitamento Materno: Por quanto tempo seu (sua) filho(a) mamou exclusivo no peito _____ meses
Sexo: Masculino () Feminino () Peso _____ Estatura _____ IMC _____ (kg/m²)

QUESTIONÁRIO 1 (ASMA):

(6 a 14 anos)

1. Alguma vez na vida seu (sua) filho(a) teve sibilos (cansaço, chiado no peito)?
Sim () Não () Se você respondeu Não, passe para a questão número 6.
2. Nos últimos 12 meses, seu (sua) filho (a) teve sibilos (cansaço, chiado no peito)?
Sim () Não ()
3. Nos últimos 12 meses, quantas crises de sibilos (cansaço, chiado no peito) seu(sua) filho(a) teve?
Nenhuma crise () 1 a 3 crises () 4 a 12 crises () mais de 12 crises ()
4. Nos últimos 12 meses, com que frequência seu (sua) filho (a) teve seu sono perturbado por chiado no peito?
Nunca acordou com chiado () Menos de 1 noite por semana () 1 ou mais noites por semana ()
5. Nos últimos 12 meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que seu (sua) filho (a) conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?
Sim () Não ()
6. Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve asma?
Sim () Não ()
7. Nos últimos 12 meses, teve chiado no peito após exercícios físicos?
Sim () Não ()
8. Nos últimos 12 meses, seu (sua) filho (a) teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?
Sim () Não ()

QUESTIONÁRIO 2 (Rinite Alérgica)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado

1. Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado?

Sim Não

- Se a resposta foi Não, passe para a questão 6.

2. Nos últimos 12 (doze) meses, seu (sua) filho (a) teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou com resfriado?

Sim Não

- Se a resposta foi Não, passe para a questão 6.

3. Nos últimos 12 (doze) meses, esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

Sim Não

4. Em qual dos últimos 12 (doze) meses esse problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu)

Janeiro

Abril

Julho

Outubro

Fevereiro

Maio

Agosto

Novembro

Março

Junho

Setembro

Dezembro

5. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes as atividades diárias do seu (sua) filho (a) foram atrapalhadas por esse problema nasal?

Nada

Um pouco

Moderado

Muito

6. Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve rinite?

Sim Não

7. Possui animal de estimação?

Sim Não

Se sim, quantos? _____

Qual (is)? _____

8. Você fuma ?

Sim Não

QUESTIONÁRIO COVID/ESQUISTOSOMOSSE/ACE2 E BCG

1. Foi infectado pelo novo coronavírus/ teve COVID-19? Se sim, quando?
Sim () _____ Não ()
2. Quais são os sintomas sentiu quando estava com COVID-19?
Febre () Dor de cabeça ()
Fadiga/Cansaço () Diarreia ()
Tosse () Falta de ar ()
Perda de olfato e paladar / ficou sem sentir cheiro e gosto ()
Outros: _____
3. Quando estava com COVID-19 necessitou de internação e/ou intubação?
Sim () Não ()
4. Procurou atendimento hospitalar quando percebeu os sintomas da COVID-19?
Sim () Não ()
5. Teve alguma sequela da COVID-19?
Sim () Não ()
6. Realizou algum teste para COVID-19? Se sim, qual?
Nenhum ()
RT-PCR ()
Sorológico laboratorial ()
Teste rápido – sorológico ()
Teste rápido – antígeno ()
7. O teste/exame realizado foi positivo ou negativo para o novo coronavírus?
Positivo () Negativo ()
8. Utilizou algum tipo de tratamento para COVID-19? Se sim, qual?
Sim () _____ Não ()
9. Foi vacinado contra COVID-19? Se sim, quantas doses?
Sim () Não ()
Número de doses _____
10. Se vacinado, o dia da última dose? _____
11. Qual a vacina tomada? _____
12. Outros familiares tiveram COVID-19?
Sim () Não ()

13. Se os familiares foram negativos, esse resultado foi através do exame ou pela ausência de sintomas? _____
14. Já teve Esquistossomose?
Sim () Não ()
15. Já fez tratamento para Esquistossomose? Se sim, quantas vezes?
Sim () _____ Não ()
16. Reside próximo a rios, açudes?
Sim () Não ()
17. Precisa passar por rios e açudes ou utiliza-os para alguma atividade diária? Por exemplo: lavar roupas.
Sim () Não ()
18. Teve febre nas últimas 48 e 72 horas?
Sim () Não ()
19. Realizou algum transplante?
Sim () Não ()
20. Fez uso de Ivermectina, Aciclovir, Corticoide, Hidroxicloroquina (Kit – Covid)?
Sim () Não ()
21. Atualmente faz uso de corticoide?
Sim () Não ()
Qual? _____
22. Apresenta alguma das situações abaixo?
Diabetes ()
Hipertensão ()
HIV ()
Leishmaniose ()
Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC ()
Enfisema pulmonar ()
Lúpus ()
Artrite reumatoide ()

INFORMAÇÕES SOBRE BCG

Possui marca da vacina BCG?

() sim () não

Você foi revacinado com BCG?

() sim () não

Possui sintomas de tuberculose?

- Tosse por mais de três semanas, podendo haver sangue; ()
- Dor ao respirar ou tossir; ()
- Febre baixa; ()
- Suor frio; ()
- Sensação de falta de ar; ()
- Perda de peso sem causa aparente ()

Você já teve tuberculose?

() sim () não

Se sim, fez tratamento de tuberculose?

() sim () não

Qual exame você fez para diagnosticar a tuberculose?

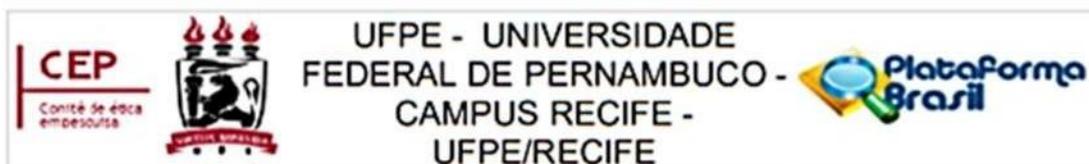
Baciloscopias () Teste rápido molecular () Cultura ()

Qual tratamento você fez para tuberculose ?

Qual antibiótico você utilizou para o tratamento?

- Isoniazida; ()
- Rifampicina; ()
- Etambutol; ()
- Pirazinamida. ()

Anexo II – Comprovante de submissão ao Comitê de ética em Pesquisa



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação in vitro da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*).

Pesquisador: CASSIA GISELLE DE OLIVEIRA NOBREGA

Versão: 1

CAAE: 38508620.9.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 110063/2020

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação in vitro da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*), que tem como pesquisador responsável CASSIA GISELLE DE OLIVEIRA NOBREGA, foi recebido para análise ética no CEP UFPE - Universidade Federal de Pernambuco - Campus Recife - UFPE/Recife em 25/09/2020 às 16:40.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br

Anexo III – Carta de anuência do LIKA (local de realização das técnicas laboratoriais)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos, para os devidos fins, que estamos cientes e concordamos com o desenvolvimento do projeto **Infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação *in vitro* da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*), sob a coordenação da Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza, para uso das instalações do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE).**

Recife, 17 de Setembro de 2020.

Assinatura manuscrita em azul de José Luiz de Lima Filho.

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-UFPE

Prof. José Luiz de Lima Filho
Diretor
LIKA / UFPE
5742 5146-1133637

**Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária – Recife – PE CEP 50670-901
Fone: 81 2126-8000**

Anexo IV – Carta de anuência da Secretaria de Saúde de Escada (local onde foram selecionados os pacientes)



PREFEITURA MUNICIPAL DA ESCADA
SECRETARIA DE SAÚDE SUSTENTÁVEL
Departamento de Vigilância à Saúde

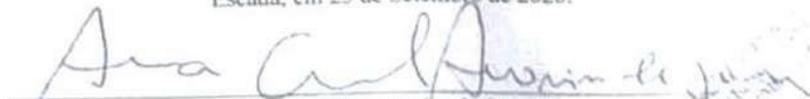
CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos (o) a pesquisador (a) Cassia Giselle de Oliveira Nóbrega, a desenvolver o seu projeto de pesquisa (*Infeção por Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação *in vitro* da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*)), que está sob a coordenação/orientação do (a) Prof. (a) Valdênia Maria Oliveira de Souza, cujo objetivo é Avaliar os níveis de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 no plasma e a resposta imune de memória inata e adaptativa, através do cultivo de células do sangue periférico, de indivíduos com infecção por *S. mansoni* e/ou com asma, bem como de vacinados ou não para BCG, em resposta ao SARS-CoV-2 e antígenos do ácaro, em pacientes atendidos em postos de saúde do município de Escada

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos das Resoluções do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, comprometendo-se utilizar os dados pessoais dos participantes da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar a esta Instituição o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Escada, em 23 de Setembro de 2020.


Ana Cecília Amorim de Souza

**SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DA ESCADA**
CNPJ: 10.291.311/0001-80 - E-mail: secretaria.saude.escada@hotmail.com
1ª Trav. Com. José Pereira, s/n - Atalaia - Escada - PE - CEP: 55.500-000 e aqui

APÊNDICES

Termo de consentimento livre esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (Infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação *in vitro* da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*)), que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Cassia Giselle de Oliveira Nóbrega, Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, 50670-901 – 81 99518-1557 – cassia.nobrega@ufpe.br. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Mariana Quitéria de Moraes Silva (81) 99721-942, Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho (81 21263918), Décio Medeiros (81 21263918), Dirceu Solé (11 55791590), Virgínia Maria Barros de Lorena (81 2101-2559), Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (81 21268525) e Thaís Emmanuely Melo (81 21012515), e está sob a orientação de Valdênia Maria Oliveira de Souza, Telefone: (81) 2126-8484, e-mail: valdenia.souza@ufpe.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem nenhuma penalidade.

A pesquisa pretende diagnosticar e tratar pacientes com vermes intestinais e estudar os componentes do sangue que indicam imunidade ao coronavírus e que estão relacionados a alergia em pessoas com vermes intestinais. A sua participação é voluntária e se dará por meio de coleta de fezes para realização de exames de fezes, entrevista sobre as doenças alérgicas, teste de alergia na pele e retirada de 18 ml (4 colheres de chá) de sangue da veia do braço com agulha e seringa descartáveis para exames de sangue. A coleta de sangue e o teste de alergia serão realizados individualmente, no posto de saúde, uma única vez.

Os riscos decorrentes da sua participação na pesquisa são a possibilidade de constrangimento no momento da coleta das fezes e durante a realização das entrevistas, coceira no braço por causa do teste alérgico na pele, aparecerem hematomas (mancha roxa) no local da retirada de sangue, porém, asseguramos que serão tomados todos os cuidados necessários para que este fato não aconteça. Pode ocorrer também algum mal estar (enjoo, vômitos, diarreia) para vermes, que são raros e, de qualquer forma deverá ser tomada, pois os vermes fazem mal à saúde e devem ser eliminados. Garantiremos a confidencialidade das informações prestadas, assim como o anonimato de todos os que participarem da pesquisa.

Se o (a) Sr (a) permitir a sua participação, estará contribuindo para entender sobre a imunidade para o coronavírus e doenças alérgicas e melhorar o diagnóstico e escolha do tratamento utilizado pelos pacientes com asma e parasitado por vermes. Além disso, você realizará um exame de fezes e um de sangue, receberão os resultados do mesmo e em caso de alguma alteração nos resultados serão agendados para uma consulta médica. Os que tiverem vermes serão tratados e será verificado se a parasitose foi eliminada a cada 3 meses (até completar um ano), receberá orientações de higiene e métodos para evitar novas infecções. No caso das pessoas alérgicas, o tratamento seguirá normalmente.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos

pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (questionário de alergia e resultados dos exames de fezes e de sangue) ficarão armazenados em pastas de arquivo sob a responsabilidade do pesquisador responsável e a orientadora, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife- PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

_____ (assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou a asma na sorologia para Covid-19: uma avaliação *in vitro* da influência de antígenos parasitários (SEA/SWAP) na memória imunológica inata (treinada) e adaptativa frente ao SARS-CoV-2 e aos antígenos do ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*), como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligada