



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

STELLA REZENDE MELO

Infecção de linfócitos B humanos pelo Vírus Sincicial Respiratório

Ribeirão Preto

2022

STELLA REZENDE MELO

**Infecção de linfócitos B humanos pelo Vírus Sincicial
Respiratório**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Eurico de Arruda Neto

Versão Original

Ribeirão Preto
2022

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

Ficha Catalográfica

Melo, Stella Rezende

Infecção de linfócitos B humanos pelo Vírus Sincicial Respiratório.
Ribeirão Preto, 2022.

p48 : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada á Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Arruda Neto, Eurico.

1. Vírus sincicial respiratório.
2. infecção de linfócitos B.
3. resposta de linfócitos B.
4. células Jeko-1.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Candidato(a): Stella Rezende Melo

Título da Dissertação/Tese: "Infecção de linfócitos B humanos pelo Vírus Sincicial Respiratório.

Orientador: Eurico de Arruda Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

William e Marialice

Que me criaram com todo o amor, ternura, confiança e dignidade que alguém pode desejar na vida.

Sem meus pais amados, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto por me receber em seu laboratório, por todos os ensinamentos que me transmitiu, pela oportunidade de fazer parte de um grupo maravilhoso que me ofereceu uma grande oportunidade de crescimento.

Ao Ronaldo Bragança Martins Junior por me ajudar em cada um dos momentos em que tive dificuldades e duvidei da minha capacidade.

A todos os alunos e integrantes do Laboratório do Prof. Eurico que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização do meu trabalho.

A todas as pessoas que tive oportunidade de conhecer e que de alguma forma contribuíram com o meu trabalho, uma brincadeira, um empréstimo de material, um café, um bate-papo.

Agradeço à agência de fomento CAPES pelo auxílio financeiro, possibilitando assim a realização deste trabalho.

Aluno: Stella Rezende Melo

Matrícula USP: 9172281

Bolsa de fomento: CAPES

Programa: PROEX

RESUMO

MELO, S. R. **Infecção de linfócitos B humanos pelo Vírus Sincicial Respiratório.** 2022. 48f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é frequente causa de infecção respiratória aguda (IRA) em crianças. Em estudo anterior detectamos HRSV (por RT-PCR em tempo real) em 15% das crianças com hipertrofia amigdalina crônica sem sintomas de IRA, indicando que essas crianças podem ser portadoras silenciosas e saudáveis. Dados preliminares do laboratório incluem a detecção de proteínas estruturais do HRSV em células linfomononucleares de tonsilas e de linfonodos, incluindo linfócitos T CD4+ e B. O presente estudo visou a investigar os efeitos da infecção por HRSV especificamente em linfócitos B. Nosso objetivo foi analisar o impacto do HRSV na viabilidade celular e funcionalidade de linfócitos B infectados com HRSV. Confirmamos a presença de infecção natural em linfócitos B de tonsilas humanas, inclusive com formação de estruturas indicativas de corpos de inclusão. HRSV também infecta *in vitro* linfócitos B purificados de tonsilas humanas, também com formação de corpos de inclusão. Em seguida, estudamos a infecção por HRSV na linhagem de linfócitos B Jeko-1, e constatamos que ela é susceptível ao HRSV, com a presença de estruturas semelhantes a corpos de inclusão. A porcentagem de Jeko-1 infectada por HRSV determinada por citometria de fluxo 24h e 240h após a infecção foi de 40% e 4%, respectivamente. A infecção por RSV não reduziu significativamente a viabilidade de células Jeko-1. Os dados indicam que embora haja acúmulo de RNA viral nas células, isso não se reflete em aumento correspondente no sobrenadante. De modo inusitado, a dosagem por real-time PCR dos RNAs mensageiros virais mostrou ausência quase completa de RNAm para a proteína L. A secreção de citocinas no sobrenadante de células Jeko-1 infectadas HRSV mostrou ser diferente de células inoculadas com mock, especialmente evidenciado por aumento na secreção de IL-6, IL-10 e TNF- α nas células infectadas. O presente modelo *in vitro* de infecção de linhagem de célula B por HRSV ratifica a capacidade do HRSV de infectar linfócitos B, com formação de fábricas virais, porém com permissividade comprometida, favorecendo uma infecção pouco produtiva e de longa duração.

Palavras-chave: vírus sincicial respiratório; infecção de linfócitos B; resposta de linfócitos B; células Jeko-1.

ABSTRACT

MELO, S. R. **Infection of human B lymphocytes by Respiratory Syncytial Virus.** 2022. 48f. Thesis (Ph.D. Degree). Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is a frequent cause of acute respiratory infection (ARI) in children. In a previous study, we detected HRSV (by real-time RT-PCR) in 15% of children with chronic tonsillar hypertrophy without ARI symptoms, indicating that these children may be silent healthy carriers. Preliminary laboratory data evidenced detection of HRSV structural proteins in lymphomononuclear cells of tonsils and lymph nodes, including CD4⁺ T and B lymphocytes. The present study aimed to investigate the effects of HRSV infection specifically on B lymphocytes, the impact of HRSV on viability and functionality of HRSV-infected B lymphocytes. We confirmed the presence of natural infection in human tonsil B lymphocytes, including formation of structures indicative of inclusion bodies. HRSV also infects in vitro purified B lymphocytes from human tonsils, also with formation of inclusion bodies. Next, we studied the HRSV infection in the Jeko-1 B lymphocyte lineage, and found that it is susceptible to HRSV, with the presence of inclusion body-like structures. The percentage of HRSV-infected Jeko-1 determined by flow cytometry 24h and 240h after infection was 40% and 4%, respectively. RSV infection did not significantly reduce the viability of Jeko-1 cells. The data indicate that although there is accumulation of viral RNA in the cells, this is not reflected in a corresponding increase of virus RNA progeny in the supernatant. Unexpectedly, the real-time PCR measurement of viral messenger RNAs showed almost complete absence of RNAm for the L protein. The secretion of cytokines in the supernatant of HRSV infected Jeko-1 cells showed to be different from mock inoculated cells, especially evidenced by increased secretion of IL-6, IL-10 and TNF- α in infected cells. The present in vitro model of B cell lineage infection by HRSV confirms the ability of HRSV to infect B lymphocytes, with the formation of viral factories, but with compromised permissiveness, favoring an unproductive and long-lasting infection.

Keywords: respiratory syncytial virus; lymphocyte B infection; B lymphocyte response; Jeko-1 cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: porcentagem

°C: graus centígrados

µL: microlitro

µg: micrograma

Aa: aminoácidos

cDNA: DNA complementar

cm²: centímetros quadrados

CO₂: gás dióxido de carbono

DICT 50%: dose infectante de 50% do tecido

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTRI: doença do trata respiratório inferior

DTRS: doença do trata respiratório superior

ECP: efeito citopático

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

g: gramas

HCl: ácido clorídrico

HRSV: Vírus Sincicial Respiratório Humano

IF: imunofluorescência

IFI: imunofluorescência indireta

IRA: infecção respiratória aguda

ITRS: infecção do trato respiratório superior

Kb: kilo-base

Kg: quilogramas

mg: miligramas

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: mililitros

mM: milimolar

RNAm: RNA mensageiro

ng: nanograma

PBS: solução salina fosfatada

pH: potencial hidrogeniônico

pM: picomolar

pmol: picomol

qPCR: PCR em tempo real

RNA: ácido ribonucleico

RNP: complexo ribonucleoprotéico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

S.F.B.: soro fetal bovino

V: volt

Sumário

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>13</u>
1.1	IMPORTÂNCIA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA	13
1.2	VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO	14
1.3	IMUNOPATOGÊNESE	15
<u>2</u>	<u>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</u>	<u>18</u>
3.1	CULTURA CELULAR E PROPAGAÇÃO VIRAL	19
3.2	TITULAÇÃO VIRAL	19
3.3	PREPARAÇÃO DO TECIDO DA AMÍGDALA HUMANA	20
3.4	PROTOCOLO FICOLL - PAQUE PLUS	20
3.5	IMUNOFLUORESCÊNCIA	20
3.6	CURVA DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS	21
3.7	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR	22
3.8	CITOMETRIA DE FLUXO E SEPARAÇÃO CELULAR ASSOCIADA À FLUORESCÊNCIA (FACS)	22
3.9	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	23
3.10	QUANTIFICAÇÃO DE RNAs MENSAGEIROS DAS PROTEÍNAS VIRAIS	24
<u>4</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>26</u>
4.1	INFECÇÃO NATURAL POR HRSV DE LINFÓCITOS B EM AMÍGDALAS HUMANAS	26
4.2	INFECÇÃO IN VITRO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE LINFÓCITOS B DE TONSILAS HUMANAS COM HRSV	26
4.3	INFECÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM JEKO-1 DE LINFÓCITOS B POR HRSV	28
4.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE HRSV EM CÉLULAS JEKO-1	30
4.5	AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DE HRSV E EXPRESSÃO DOS RNAs MENSAGEIROS VIRAIS EM CÉLULAS JEKO-1	30
4.6	ALTERAÇÃO DA CAPACIDADE DE RESPOSTA COM PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS JEKO-1 INFECTADAS POR HRSV	32
<u>5</u>	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>35</u>

535

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância clínica e epidemiológica

O vírus sincicial respiratório humano (HRSV) é um patógeno de grande importância em pediatria, que causa cerca de 33 milhões de casos anuais de infecção respiratória aguda (IRA) em crianças de todo o mundo, embora seja também importante causa de IRA em idosos e imunocomprometidos (1). O HRSV é uma das principais causas de hospitalização e morte entre crianças menores de 5 anos, especialmente neonatos nos 6 primeiros meses de vida (2). Segundo Tabor et al., 2021, no ano de 2015, nos países em desenvolvimento, o HRSV foi associado a 33.1 milhões de casos de infecção do trato respiratório inferior, 3.2 milhões de hospitalizações e 118.000 mortes em menores de 5 anos de idade (3).

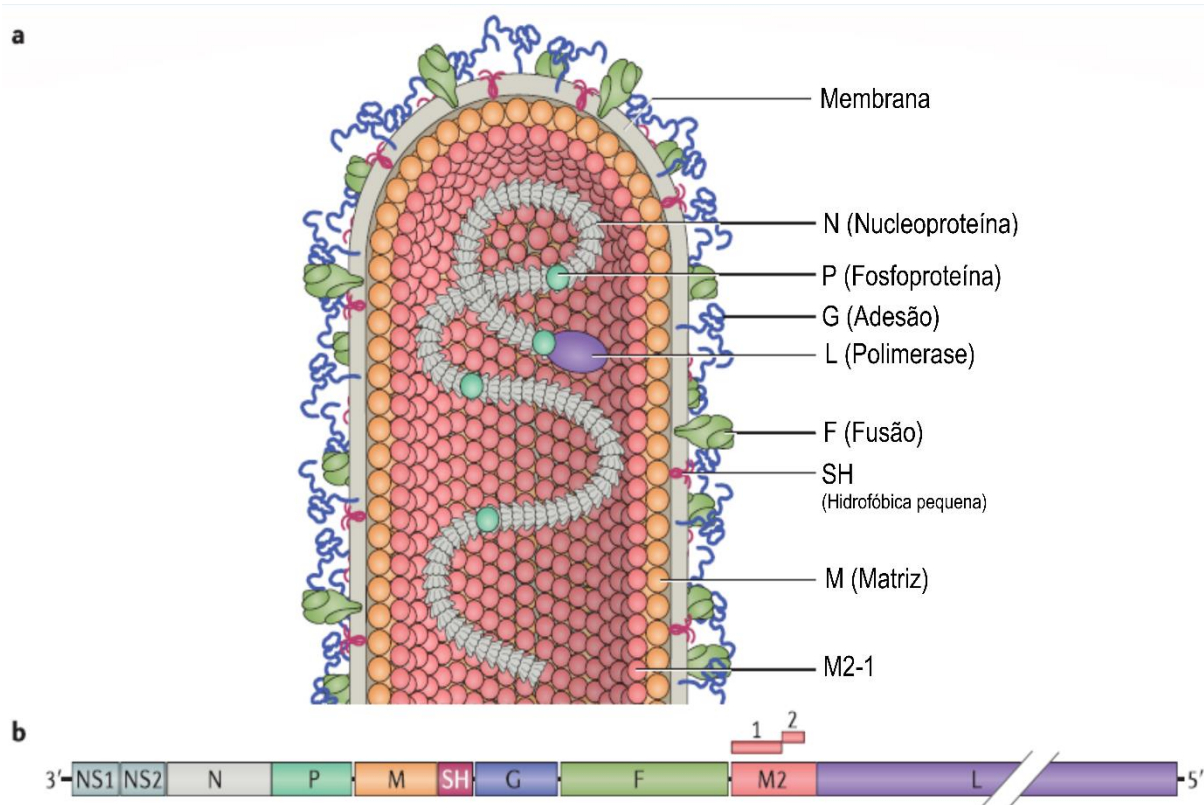
A transmissão do HRSV se dá por secreções e aerossóis de pessoas infectadas (4). A infecção se dá principalmente em células epiteliais do trato respiratório (5). Os primeiros sintomas surgem de 3 a 7 dias após o contágio (4,5). Os sintomas mais comuns são tosse, espirro, secreção e congestão nasais (4), mas em neonatos e lactentes HRSV pode causar pneumonia e bronquiolite, e frequentemente se complica com otite média aguda (6).

Apesar das infecções por HRSV em crianças maiores saudáveis e adultos serem em geral restritas ao trato respiratório superior e de pouca gravidade, 20 a 30% das crianças têm acometimento do trato respiratório inferior, como bronquiolite e pneumonia (7). Há evidências de maior mortalidade por HRSV em pacientes idosos hospitalizados do que por influenza (8).

Não existe tratamento ou vacina eficaz contra HRSV, mas há imunoprofilaxia com anticorpo monoclonal humanizado, o Palivizumab, de alto custo, para uso em crianças de alto risco (9–11). Pacientes infectados frequentemente são hospitalizados em unidade intensiva, submetidos a ventilação mecânica, e podem desenvolver sequelas, como asma e broncoespasmo, o que significa grande impacto econômico (3,6,7,12).

1.2 Vírus Sincicial Respiratório

O HRSV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Pneumoviridae*, gênero *Orthopneumovirus*, espécie *Human orthopneumovirus* (ICTV, 2017). É um vírus envelopado, pleomórfico que pode apresentar tanto a forma esférica quanto filamentosa. O HRSV tem um complexo ribonucleoproteico que protege o seu RNA de fita única e polaridade negativa (13,14).



Fonte: adaptado de Battles & McLellan, 2019⁽¹⁶⁾.

Figura 1. Estrutura do HRSV. (a) representação esquemática da partícula viral do HRSV em sua forma filamentosa com o arranjo das proteínas na partícula viral. (b) Representação esquemática do genoma viral, composto por 10 genes que codificam 11 proteínas, pois o gene M2 codifica duas proteínas: M2-1 e M2-2 (15).

O genoma do HRSV tem aproximadamente 15,2 Kb e é composto por 10 genes que codificam 11 proteínas, sendo 9 proteínas estruturais (G, F, SH, M, M2-1, M2-2, N, P e L) e 2 proteínas não-estruturais (NS1 e NS2). A glicoproteína de adesão (G) permite que a partícula viral se fixe à célula hospedeira. A proteína de fusão (F) medeia a fusão do envoltório viral com a membrana celular, promovendo a liberação

do nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula hospedeira, onde ocorre todo o processo de replicação do vírus. O RNA (-) viral entra na célula hospedeira juntamente com a RNA polimerase e outros componentes do nucleocapsídeo (16), e no citoplasma o genoma é transcrito pela polimerase, com o auxílio da proteína M2-1, em RNAs mensageiros individuais para cada proteína. Quando os RNAs atingem uma certa quantidade, o complexo da polimerase deixa de transcrever, e passa a replicar o RNA (-), primeiro produzindo o antígenoma, uma fita de RNA (+) que servirá de molde para a transcrição dos RNA (-) genômicos (17). O gene M2-2 regula a transição da transcrição para a replicação, e tanto o genoma quanto o antígenoma são revestidos com a proteína N. A proteína M regula a montagem do HRSV através da interação com as proteínas do envelope F e G, e com as proteínas do nucleocapsídeo N, P, e M2-1. Após a montagem, ocorre o brotamento pela aquisição do envelope a partir da membrana plasmática da célula hospedeira (17–21).

1.3 Imunopatogênese

Um estudo anterior do nosso grupo revelou que o RNA de HRSV está presente em 17,2% de tecidos tonsilares de crianças submetidas a adenotonsilectomia para tratamento de hiperplasia tonsilar (22). As amígdalas e adenoides são consideradas importantes na primeira linha de defesa contra grandes quantidades de microrganismos inalados (23). Microrganismos podem ser mantidos nas criptas tonsilares, onde há células apresentadoras de antígenos que os transportam da luz para apresentação aos linfócitos T auxiliares (23,24). Os linfócitos T liberam mediadores inflamatórios que estimulam a montagem de resposta imune apropriada (25).

De uma forma simplificada, os subconjuntos de células Th1 e Th2 são diferenciados pelo seu perfil de citocinas (26). Os clones Th1 são geralmente caracterizados pela produção de IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (26). Este subconjunto está envolvido na inflamação mediada por células e reações de hipersensibilidade tardias, sendo fundamental para a imunidade a patógenos intracelulares e para perpetuar a resposta autoimune (26,27). Em contraste, os clones Th2 neutralizam a resposta mediada por Th1, promovendo uma resposta mais focada na ação anti-inflamatória, na defesa contra parasitas multicelulares e estão envolvidos em alergias e doenças atópicas. As principais interleucinas produzidas pelas células Th2 são IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (26,27).

Como estratégia de replicação e consolidação da infecção, os vírus respiratórios podem suprimir a resposta imune inata e levar a uma resposta imune adaptativa incompleta, tardia ou enfraquecida (28).

HRSV não induz resposta imune vigorosa, e assim reinfecções por cepas virais semelhantes ou diferentes são comuns (29). Essas reinfecções podem alterar respostas imunes a infecções prévias, e podem compor uma estratégia de persistência com replicação em títulos baixos, e persistindo nas células hospedeiras (29,30).

Por serem mais acessíveis, as proteínas de superfície do HRSV são os principais antígenos reconhecidos pelos linfócitos B, mas peptídeos de outras proteínas virais apresentados nas superfícies de células infectadas e proteínas virais secretadas por elas também podem estimular linfócitos (31).

A ativação de linfócitos B contra HRSV é dependente da atividade de citocinas liberadas pelos linfócitos T auxiliares (Th), mas estas células também são apresentadoras de antígenos e, logo após sua ativação, também podem interagir diretamente com os linfócitos Th no processo de estimulação recíproca, e então as citocinas produzidas pelos linfócitos Th juntamente com o reconhecimento do antígeno pelos receptores de células B resultam na estimulação, proliferação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, que irão secretar anticorpos (31). A interação com o antígeno e as citocinas secretadas pelos linfócitos Th estimula a rápida e abundante multiplicação de linfócitos B, que podem se diferenciar em plasmócitos e secretar imunoglobulinas, ou se diferenciar em células de memória, aumentando a capacidade de combater as reinfecções por um mesmo patógeno (31,32). A resposta imune humoral tem como principal característica o bloqueio de infecções e a eliminação de patógenos extracelulares por meio da neutralização de antígenos, ativação do sistema do complemento, ou da sua opsonização para fagocitose(31).

Rico et al., 2009 (33) e Valarcher et al., 2001 (34), mostraram que HRSV é capaz de infectar linfócitos B murinos e bovinos, respectivamente. Enquanto Valarcher et al, 2001 (34) avaliaram apenas a persistência do vírus nestas células, mas não o efeito causado na célula pela infecção, Rico et al, 2009 (33) observaram que linfócitos B infectados com HRSV aumentaram a expressão de MHC classe II e CD86, mas não

MHC classe I. Este achado sugere que os linfócitos B infectados com HRSV estão sendo ativados (34), mas não foram avaliados quanto à sua funcionalidade.

2 Justificativa e objetivos

Existem poucos estudos sobre a infecção por HRSV em linfócitos B humanos e as consequências que isso pode ter no sistema imunológico, e como isso pode estar relacionado ao fato de o HRSV ser capaz de persistir por um período prolongado nessas e em outras células do hospedeiro.

Estudos anteriores do nosso grupo (22,35) mostraram que HRSV é capaz de infectar células do tecido linfoide, e proteínas virais foram encontradas em tecidos como linfonodos e amígdalas. Linfócitos e macrófagos foram positivos para HRSV, o que indica que o vírus é capaz de infectar células do sistema imunológico. Diversos vírus respiratórios são detectados por PCR e imuno-histoquímica em tecidos linfoides em tonsilas de crianças submetidas a adeno-tonsilectomia na ausência de sintomas de infecção respiratória por pelo menos 30 dias antes da intervenção cirúrgica. Observamos que macrófagos e linfócitos T CD4 eram as mais frequentes células infectadas por HRSV. Quando examinamos linfonodos hiperplásicos, tecidos linfoides secundários não relacionados ao epitélio respiratório, abundantes linfócitos B foram detectados em centros germinativos com marcação para HRSV (35). Diante desses resultados, este estudo objetivou avaliar os efeitos da infecção de linfócitos B por HRSV, dentro do objetivo geral de avaliar especificidades da relação de HRSV com essas células, que possam contribuir para entender sua persistência no organismo. Para isso, nossos objetivos específicos foram:

1- Avaliar a infecção natural de linfócitos B humanos CD20⁺ por HRSV, utilizando tonsilas hipertróficas removidas cirurgicamente, determinando a presença de proteínas estruturais virais por imunofluorescência (IF) e citometria de fluxo.

2- Infectar células B da linhagem Jeko-1 e culturas primárias de células obtidas de tonsilas, com HRSV, para avaliar susceptibilidade e permissividade.

3- Avaliar a viabilidade de linfócitos B da linhagem Jeko-1, infectados in vitro por HRSV.

4- Verificar se há comprometimento da produção de imunoglobulinas e o perfil de citocinas produzidas por células B da linhagem Jeko-1 infectadas por HRSV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e propagação viral

As células HEp-2 e Jeko-1 foram cultivadas em frascos de 25 cm². As monocamadas de HEp-2 foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagles (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células Jeko-1 foram mantidas em suspensão em RPMI-1640 suplementado com 20% de SFB. Todas as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. As infecções foram feitas in vitro com HRSV grupo A, utilizando a cepa Long adaptada em laboratório, com MOI igual a 1 ou 10. Para adesão e adsorção viral foi utilizado volume mínimo de meio de cultura (0% SFB) em agitação, à temperatura ambiente, durante uma hora, seguido de incubação a 37°C por mais uma hora e, só então, o meio (2% SFB) foi completado para a quantidade necessária dependendo do frasco de cultura.

3.2 Titulação Viral

A titulação do vírus foi feita em placas de 96 poços semeadas com 150.000 células Hep-2/poço para atingir 60-70% de confluência em 24 horas, quando as células foram infectadas. Células HEp-2 infectadas com HRSV foram colhidas, submetidas a congelamento e descongelamento rápido. Lisado celular e sobrenadante foram separados por centrifugação em velocidade máxima a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido, o pellet de lisado celular foi ressuscitado em RPMI-1640 sem soro. Diluições em série de dez vezes foram preparadas e inoculadas 100 µL por poço, em quadruplicata, as placas foram incubadas por 1 hora, à temperatura ambiente em agitação e depois incubadas durante 1 hora a 37°C em 5% de CO₂ e umidade. O inóculo foi removido, os poços lavados uma vez com PBS 1x, completados com 100 µL de DMEM com 2% de FBS e a placa foi incubada por 48 horas. As placas foram lavadas com PBS para remoção de resíduos de meio de cultura e então foram coradas e fixadas adicionando-se 100 µL da solução de uso do cristal violeta/ metanol gelado. As placas foram incubadas durante 15 minutos em freezer a -20° C. Após a incubação, foram lavadas para retirar o excesso de cristal violeta/ metanol e secas à temperatura ambiente. Os plaques foram contados e os títulos foram calculados pelo método de Reed-Muench.

3.3 Preparação do tecido da amígdala humana.

As amígdalas retiradas de crianças adenotonsilectomizadas, na ausência de sintomas e sinais de infecção respiratória aguda nos 30 dias anteriores à cirurgia, foram processadas assim que chegaram ao laboratório. As amígdalas foram maceradas e dissociadas enzimaticamente. A dispersão dos tecidos tonsilares foi realizada utilizando 100 U das enzimas proteolíticas colagenase tipo I (Gibco) e 0,6 U/de dispase (Gibco) por mL de PBS durante 1 hora em shaker a 37°C, em seguida passadas por cell strainer de 100 µm. As células dissociadas foram submetidas ao protocolo de Ficoll-Paque, as células linfomononucleares foram separadas e mantidas em RPMI-1640 enriquecido com 20% de Soro Fetal Bovino.

3.4 Protocolo Ficoll - Paque Plus

O ensaio Ficoll – Paque Plus foi realizado seguindo as orientações do fabricante. Em suma, a amostra foi diluída em 5 mL de PBS contendo 4% de antibiótico e antimicótico (ATB/ATM). Todo o conteúdo foi cuidadosamente depositado em 5mL de Ficoll e centrifugado a 400 x g por 30 minutos. Após a separação, quatro fases puderam ser observadas, sendo a superior o PBS, seguido pelas células linfomononucleares, ficoll e hemácias e granulócitos no fundo do tubo. A primeira fase foi removida, as células linfomononucleares foram coletadas e transferidas para um novo tubo, onde foram lavadas 3 vezes com PBS 4% ATB/ATM para que todo o ficoll fosse removido e então mantida em cultura.

3.5 Imunofluorescência

As células infectadas colhidas em pontos de tempo determinados foram lavadas três vezes com PBS, colocadas em lâminas de microscopia previamente tratadas com Biobond e secas ao ar. As células foram fixadas com acetona gelada por 7 minutos e armazenadas a -20° C. Para IF, as lâminas congeladas foram lavadas em PBS três vezes, permeabilizadas com Triton 0,5% por 5 minutos, lavadas com PBS por cinco vezes sob agitação. As lâminas foram então, bloqueadas com Superblock por 15 minutos, incubadas com o anticorpo primário apropriado por 1 hora e lavadas com PBS por cinco vezes sob agitação. Quando necessário, anticorpos secundários foram adicionados, as lâminas foram incubadas no escuro por 1 hora e lavadas novamente em PBS. As lamínulas foram montadas usando o meio de montagem in situ Duolink® com DAPI (Sigma), e as lâminas foram analisadas em um

microscópio de fluorescência (Olympus BX40). Os anticorpos usados neste estudo estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados neste estudo

Anticorpo (Referência)	Diluição
mouse MAb anti-HRSV F protein (MAB8599, Millipore)	1: 100
Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse (A21202, Invitrogen)	1: 600
FITC-labeled mouse MAb anti-HRSV N protein (MAB858-3F N, Millipore)	1: 100
Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150076)	1:1000

3.6 Curva de replicação do vírus

As células Jeko-1 foram cultivadas em frascos de 75cm² e quando a centrifugação foi necessária as células foram transferidas para um tubo de 50 mL com tampa de rosca, lavadas uma vez com RPMI-1640 sem soro e ressuspensas em 5 mL de meio fresco. As células foram contadas e ressuspensas em inóculo para atingir MOI = 1, e então devolvidas ao frasco de 75cm² onde foram incubadas pelos tempos apropriados. Em seguida, um meio suplementado com 2% de FBS foi adicionado para obter uma concentração de 2,5 x 10⁵ células/mL, e a suspensão foi distribuída 1mL por poço em placas de 24 poços e incubada à 37° C e 5% de CO₂.

Nos tempos de 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h e 240h pós-infecção, o conteúdo dos poços em triplicata foi coletado separadamente, clarificado por centrifugação, e os sobrenadantes e pellets celulares foram separados, aliquotados em TRIzol e congelados a -80°C. Alíquotas de células e sobrenadantes em TRIzol foram usadas para extração de RNA total seguindo as orientações do fabricante. O produto extraído foi quantificado com NanoDrop e o cDNA foi preparado com o kit MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific). Em seguida, os números de cópias do genoma de HRSV foram quantificados por qPCR usando uma curva padrão baseada em diluições seriadas na base 10 de um

plasmídeo pGEM-T contendo uma inserção de HRSV-A. Os oligonucleotídeos usados como iniciadores e sondas estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeos		Sondas		Alvo
		Reporter	Quencher	
APB48	CACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGC	Fan	Tamra	N
A21-F	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	---	---	N
A102-R	TGCTCCGTTGGATGGTGTATT	---	---	N

3.7 Análise de viabilidade celular

Para a análise da viabilidade das células Jeko-1 infectadas pelo HRSV, foi utilizado o kit Alamar Blue de acordo com as especificações do fabricante. Resumindo, 5 microtubos foram preparados para conter aproximadamente 150.000 células. O vírus foi inoculado em 2 dos tubos, um com MOI = 1 e outro com MOI = 10. Como controles, foram utilizadas apenas células no mesmo meio. Após a incubação, foi adicionado Alamar Blue utilizando 1 µL para cada 10 µL do volume total. O conteúdo foi homogeneizado manualmente, e as placas foram incubadas por 4 horas a 37° C e depois lidas em espectrofotômetro.

3.8 Citometria de fluxo e separação celular associada à fluorescência (FACS)

A citometria de fluxo foi realizada usando quatro frascos de 75 cm² de células Jeko-1, um frasco de controle de células, 1 frasco contendo células inoculadas com HRSV inativado por UV e dois infectados com HRSV (MOI = 1). Após 24 horas da infecção, o conteúdo de cada frasco foi transferido para um tubo de 15 mL com tampa de rosca, onde foi lavado e peletizado. As células foram então ressuspensas em Fixation and Permeabilization Solution Buffer do Kit BD Citofix/Citoperm™. Superblock foi usado para bloquear sítios inespecíficos e as células foram incubadas com o anticorpo primário para proteína F de HRSV por 1 h a 4°C. As amostras foram lavadas com tampão Perm Wash (1:10 em PBS) e incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor-488) por mais uma hora. Em seguida, as amostras foram lavadas novamente, fixadas com formaldeído a 1% e lidas em citômetro de fluxo.

Para FACS, foi utilizado o mesmo kit BD Citofix/Citoperm™, seguindo as recomendações do fabricante. Para a marcação das células infectadas, utilizou-se o anticorpo diretamente marcado contra a proteína N do HRSV, e as células foram separadas por cell sorting.

3.9 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas produzidas e liberadas no sobrenadante das culturas de células infectadas pelo HRSV foi utilizado o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Em resumo, esse kit promove a captura de analitos solúveis através de beads fluorescentes e com tamanhos conhecidos, que são detectadas por citometria de fluxo. Cada bead é conjugada com um anticorpo específico, o qual é conjugado com Ficoeritrina (PE) e, fornece sinal fluorescente proporcional a quantidade de analito ligado. Após a incubação das beads com a amostra, formam-se complexos em sanduíche (bead + analito + reagente de detecção). Esses complexos podem ser mensurados por citometria para identificar partículas com fluorescência característica de ambos, tanto da bead como do detector.

Células HEp-2 e células Jeko-1 foram inoculadas com HRSV em MOI de 1 e incubadas em estufa a 37° C, 5% de CO₂ e umidade. Nos tempos de 24, 48, 72 e 240 horas após a infecção, as células foram colhidas, centrifugadas e foi separado o sobrenadante das culturas, que foram armazenados em freezer a -80° C até o momento do uso. Neste experimento, somente o sobrenadante das culturas foi utilizado.

Seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante, os sobrenadantes foram diluídos em PBS 1x na proporção de 1:2. Em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 50 µL do mix de beads de captura, 50 µL da diluição da amostra, 50 µL do reagente de detecção Human Th1/Th2/Th17 PE e os tubos foram incubados durante 3 horas em temperatura ambiente e protegidos da luz. Todo o processo também é feito para os controles fornecidos no Kit, que para cada uma das citocinas analisadas formam uma curva padrão, permitindo assim a quantificação das citocinas presentes nas amostras testadas. Passado o período de incubação, a cada um dos tubos contendo amostras e controles, foi adicionado 1 mL de Wash Buffer, os tubos foram centrifugados a 200 x g durante 5 minutos e o sobrenadante aspirado

cuidadosamente. O pellet resultante foi ressuspenso em 300 μ L de Wash Buffer e imediatamente lido em citômetro de fluxo.

3.10 Quantificação de RNAs mensageiros das proteínas virais

Aproveitando o pellet celular separado do experimento anterior, este foi ressuspenso em 750 μ L de TRIzol e teve seu RNA total extraído, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

O produto extraído foi quantificado com NanoDrop e o cDNA foi preparado com o kit MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific), porém utilizando Oligo-dT no lugar do Random Primer. Em seguida, os números de cópias de RNAs das proteínas virais foram quantificados por SybrGreen qPCR usando uma curva padrão baseada em diluições seriadas na base 10 de um plasmídeo recombinante rA2 contendo uma inserção de HRSV-A. Os oligonucleotídeos usados como iniciadores estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos

Alvo	Sequência	Volume concentração	e
N for	ATGGCTCTTAGCAAAGTMAAG	0,125 µL (10 pMol/ µL)	
N rev	CCW GTG AAT TTA TGA TTD GCA TC		
P for	GARACATTTGAYAACAATGARGARG	0,5 µL (10 pMol/ µL)	
P rev	GCA TTC CTA RTA TYT CAC TTA ATT TYT C		
L for	ATGCTMAAYAACATCACAGATGC	0,125 µL (10 pMol/ µL)	
L rev	ACC ATH GGR TGT CCA AAK ATY CTG		
G for	GCCAAGACAYTAGAAARGAC	0,5 µL (10 pMol/ µL)	
G rev	GTR TGA TTG YAG TTG TTR GTG TGA C		
F for	CTTGGHTTYTTGTTAGGTGTTGGATC	0,5 µL (10 pMol/ µL)	
F rev	GCT GAC TAC RGC CTT GTT TGT		
SH for	AGYAAATTCTGGCCTTACTTTAC	0,125 µL (10 pMol/ µL)	
SH rev	CTT GGT ARC TCA ARG GTT TTG TTA TG		
M for	CAATATGGGTGCCYATGTTYC	1 µL (10 pMol/ µL)	
M rev	ARG CAT GTT AGA CTR CAT GC		
NS1 for	GGAGGTTATATATGGGAAATGATGG	0,125 µL (10 pMol/ µL)	
NS1 rev	CCA AGT AAT TCA GAY AAT TGA TTC		
NS2 for	CTTGATGAAAGACAGGCCACATTHAC	0,5 µL (10 pMol/ µL)	
NS2 rev	ATA AAT ATT GGC ATA GGR AAA GTG CC		

4 Resultados

4.1 Infecção natural por HRSV de linfócitos B em amígdalas humanas

Para confirmar a ocorrência de infecção natural de linfócitos B pelo HRSV, células foram dissociadas de tecido tonsilar positivo para HRSV por PCR em tempo real, e a suspensão foi submetida à imunofluorescência (IF) com marcações para CD20 (marcador de linfócitos B) e para proteína N estrutural do HRSV. HRSV foi detectado em linfócitos B e as células infectadas exibiam estruturas fortemente sugestivas de corpos de inclusão virais (Fig. 1). Este achado confirma que o HRSV pode infectar os linfócitos B naturalmente em tecidos.

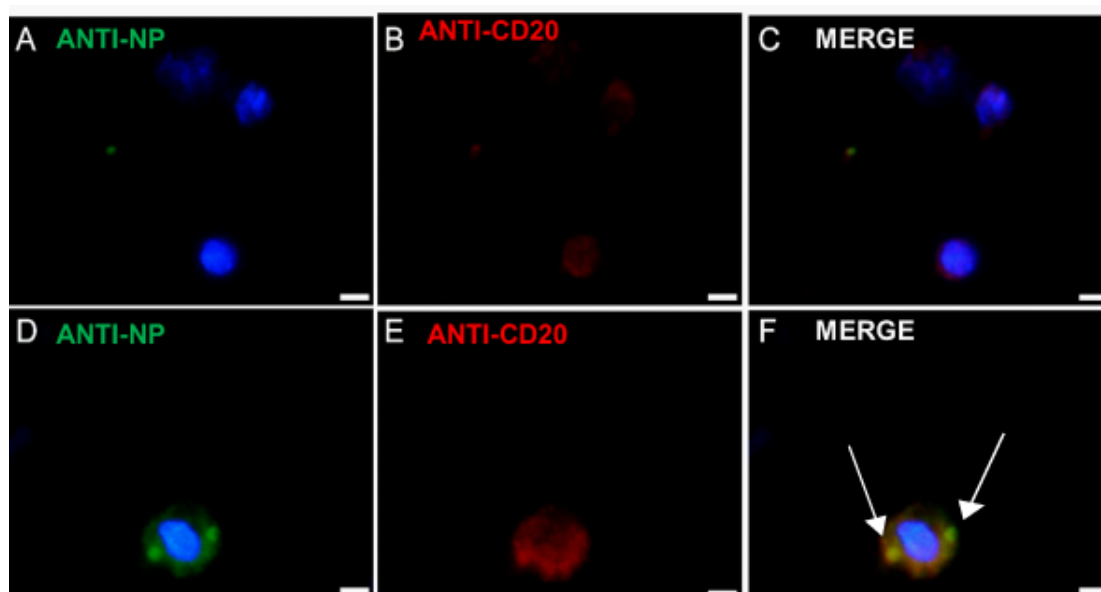


Figura 1. Imunofluorescência para HRSV em amígdala humana HRSV-positiva, naturalmente infectada. (A, B e C) Linfócitos B humanos não infectados com marcação vermelha para CD20 (B) e coloração nuclear DAPI (A). (D, E e F) Imunomarcagem fluorescente para HRSV (D), CD20 (E) e sobreposição (F). Estruturas sugestivas de corpos de inclusão de HRSV marcados para a proteína N em linfócitos B (setas brancas).

4.2 Infecção in vitro de culturas primárias de linfócitos B de tonsilas humanas com HRSV

Tecidos de amígdala palatina recém-obtidos de dois pacientes foram macerados e dissociados enzimaticamente, e as células linfo-mononucleares foram purificadas usando Ficoll-Paque Plus. As células foram infectadas com HRSV em MOI= 1 ou 10, e amostras foram colhidas às 24, 48 e 72 h após a infecção. As

preparações celulares analisadas por IF mostraram sinal de IF abundante para HRSV em células infectadas positivas para CD20, confirmando a suscetibilidade dos linfócitos B à infecção *in vitro* por HRSV em culturas primárias (Figura 2). Além disso, a coloração para a proteína HRSV N revelou a presença de estruturas fortemente sugestivas de corpos de inclusão viral (Fig. 2, seta branca), recapitulando o achado em linfócitos B naturalmente infectados (Figura 1).

Células coletadas das culturas nos mesmos tempos pós-infecção foram usadas para quantificação de equivalentes de RNA genômico de HRSV por RT-PCR, revelando falta de produção de RNA de HRSV em culturas primárias de células linfomononucleares tonsilares infectadas *in vitro* (Figura 3), apesar da observação da proteína HRSV por IF em numerosas células (Figura 2).

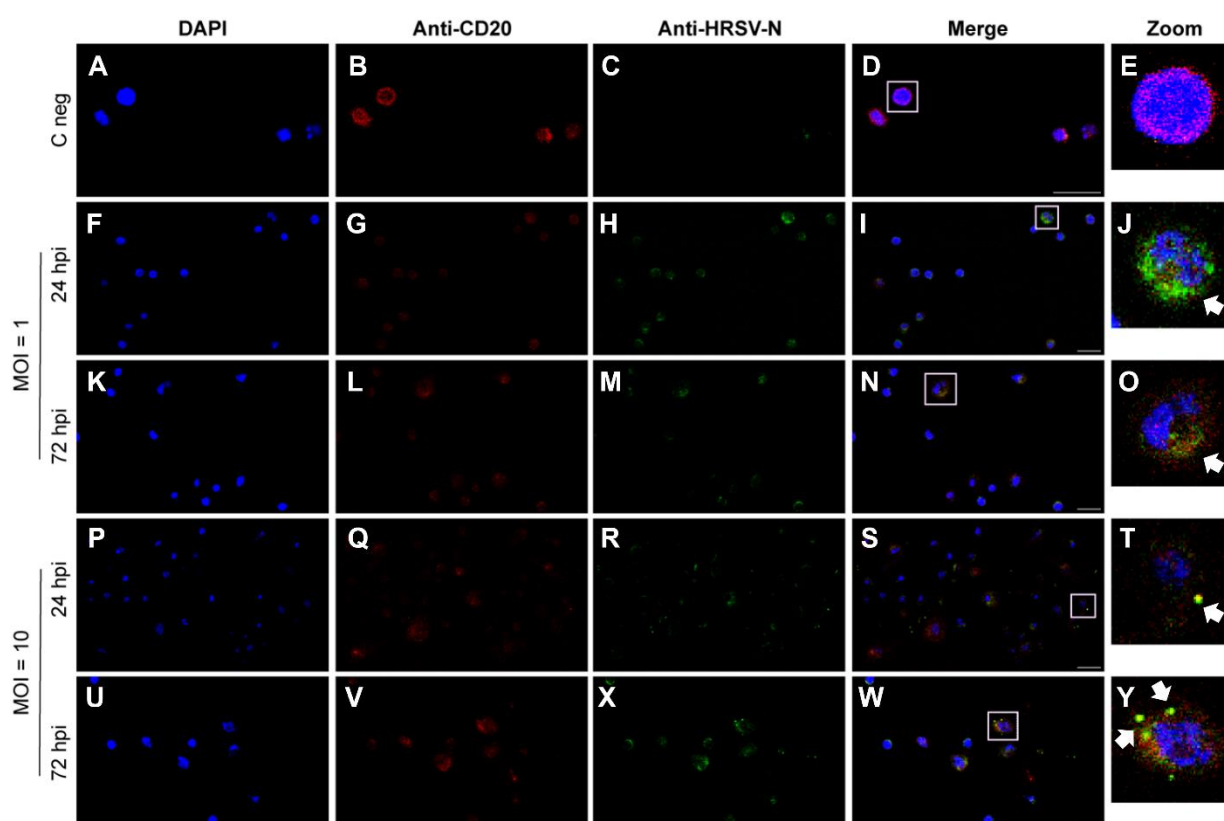


Figura 2. Imunofluorescência para HRSV de culturas primárias de células linfomononucleares tonsilares infectadas *in vitro*. (A, F, K, P, U) Marcação do núcleo celular por DAPI. (B, G, L, Q, V) Marcação de CD19 com anticorpo primário de coelho anti-CD19 e anticorpo secundário anti-coelho 594. (C, H, M, R, X) Marcação da proteína viral N com anticorpo diretamente marcado com FITC. (D, I, N, S, W) Sobreposição das imagens, com setas indicando estruturas semelhantes a corpos de

inclusão. (E, J, O, T, Y) Aumento da área marcada por quadrado, mostrando uma única célula. As setas marcam os corpos de inclusão. Barra de escala = 10 μ m.

4.3 Infecção de células da linhagem Jeko-1 de linfócitos B por HRSV

Devido à dificuldade de manter um suprimento constante de culturas primárias de tecido tonsilar, além das variações esperadas nas suscetibilidades individuais dos doadores, explorar detalhes da relação de HRSV com linfócitos B em células da linhagem Jeko-1, originária de linfoma de células do manto que, diferentemente de outras linhagens, é negativa para o vírus Epstein-Barr.

As células Jeko-1 foram infectadas *in vitro* com um estoque de HRSV A da cepa de laboratório Long (MOI=1). O HRSV induziu alterações morfológicas em células Jeko-1 infectadas indicativas de um efeito citopático sutil em comparação com células não infectadas. As culturas infectadas com HRSV mostravam células com tamanhos irregulares e formação de aglomerados, que podem ser sincícios (Figura 3B). A suscetibilidade das células Jeko-1 ao HRSV foi confirmada por IF para a proteína N viral, revelando a presença de coloração 24 h após a infecção, com a formação de estruturas semelhantes a corpos de inclusão (Figura 3D).

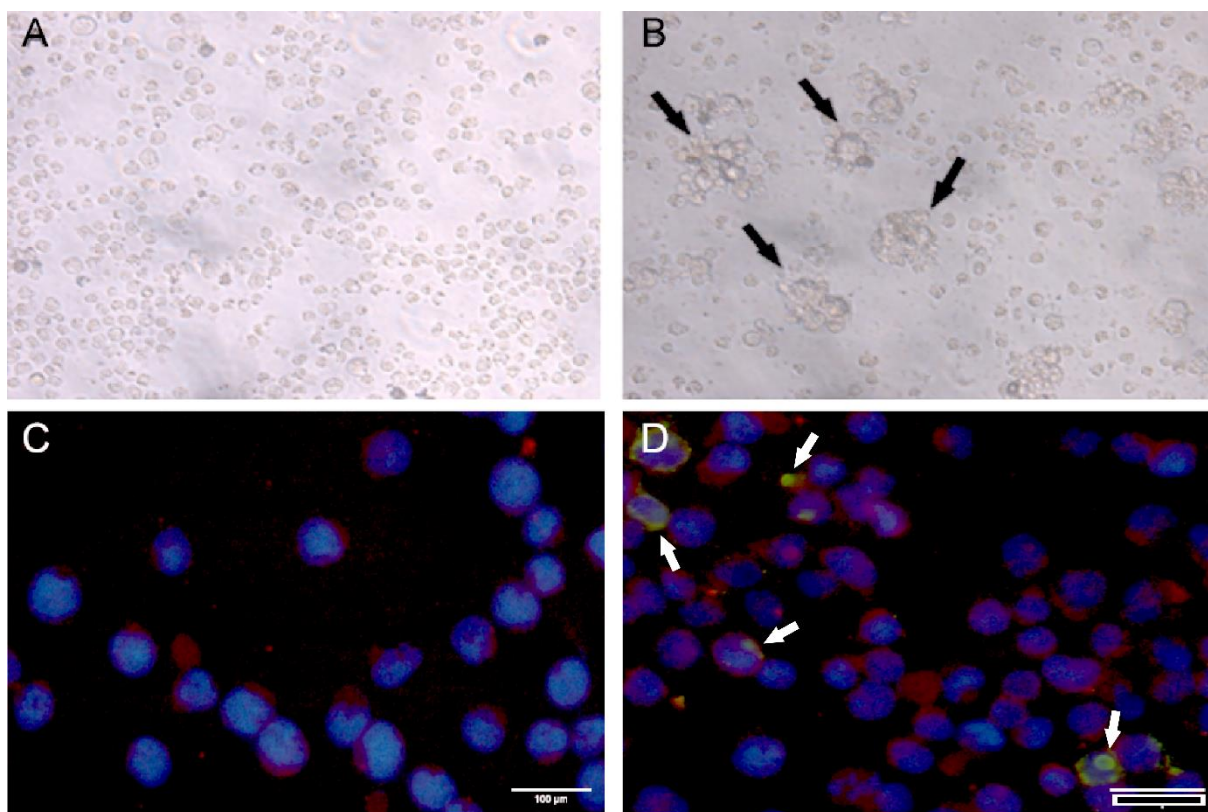


Figura 3. Infecção de células Jeko-1 por HRSV. Células Jeko-1 infectadas com HRSV (MOI=1) às 72 hpi mostrando efeito citopático (B) em comparação com células não infectadas (A), caracterizado por irregularidades de tamanho e formação de aglomerados celulares (B). Imunofluorescência com marcação do núcleo celular com DAPI e para CD19 com anticorpo primário de coelho anti-CD19 e anticorpo secundário anti-coelho 594 e marcação para a proteína N do vírus com anticorpo diretamente marcado com FITC. (C) Controle negativo. (D) Confirmação da infecção das células Jeko-1 pelo HRSV, com formação de estruturas semelhantes a corpos de inclusão (setas brancas).

Para avaliar as porcentagens de células Jeko-1 infectadas com HRSV, foi feita citometria de fluxo com marcação para proteína viral F, que revelou que aproximadamente 40% das células eram positivas para o vírus (Figura 4A e B).

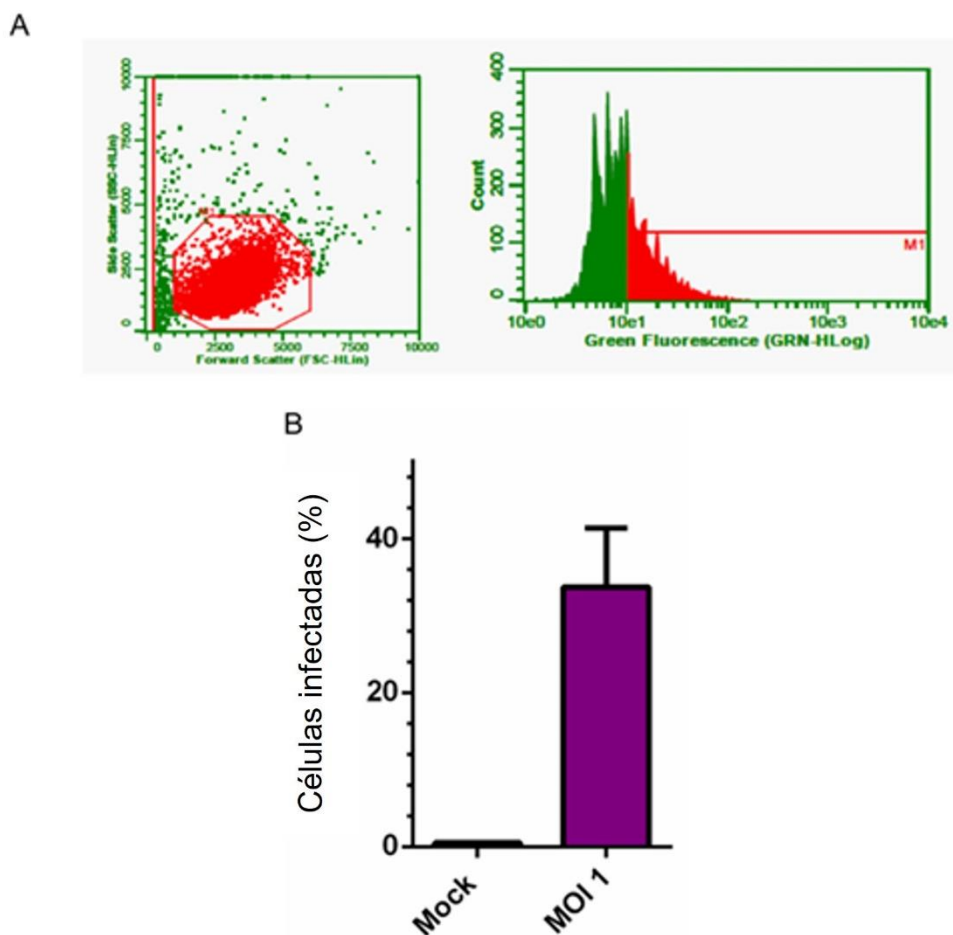


Figura 4. Quantificação da infecção por citometria de fluxo. (A) Citometria de fluxo de células Jeko-1 infectadas com HRSV (MOI = 1), a 24 hpi marcadas com proteína MAb anti-RSV F de camundongo. (B) Porcentagem de células infectadas com HRSV.

4.4 Avaliação da viabilidade de HRSV em células Jeko-1

Para avaliar a viabilidade de células Jeko-1 infectadas com HRSV, foi usado o ensaio de Alamar Blue em triplicatas de culturas infectadas, que não evidenciou perda significativa de viabilidade em comparação com células controles, independente da MOI utilizada para a infecção (Figura 5).

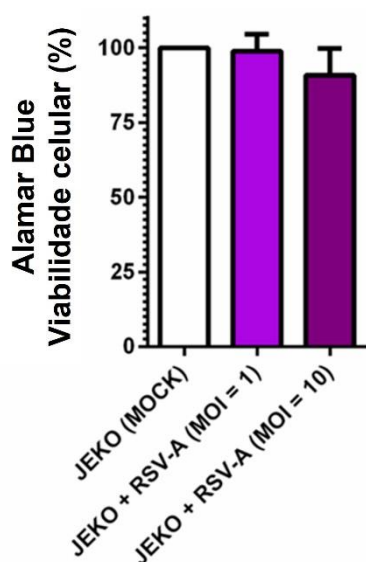


Figura 5. Ensaio de viabilidade celular. Células Jeko-1 foram infectadas em MOI=1 ou MOI=10 e incubadas por 24h. Alamar Blue foi adicionado a cultura e lido em espectrofotômetro. É possível observar que independente da MOI utilizada na infecção, não há alteração significativa na viabilidade das células.

4.5 Avaliação da carga viral de HRSV e expressão dos RNAs mensageiros virais em células Jeko-1.

Para avaliar a replicação de HRSV, células Jeko-1 foram infectadas (MOI=1) e às 24, 48 e 72 hpi células e sobrenadantes foram colhidos, clarificados por centrifugação, e o RNA de HRSV foi quantificado por PCR em tempo real. A análise indicou que a infecção por HRSV em células Jeko-1, é improdutora de RNA viral no sobrenadante, que indica que a infecção não é produtora de progênie viral, embora

tenha havido acúmulo de RNA viral genômico no interior das células até 10 dias após a inoculação (Figura 6).

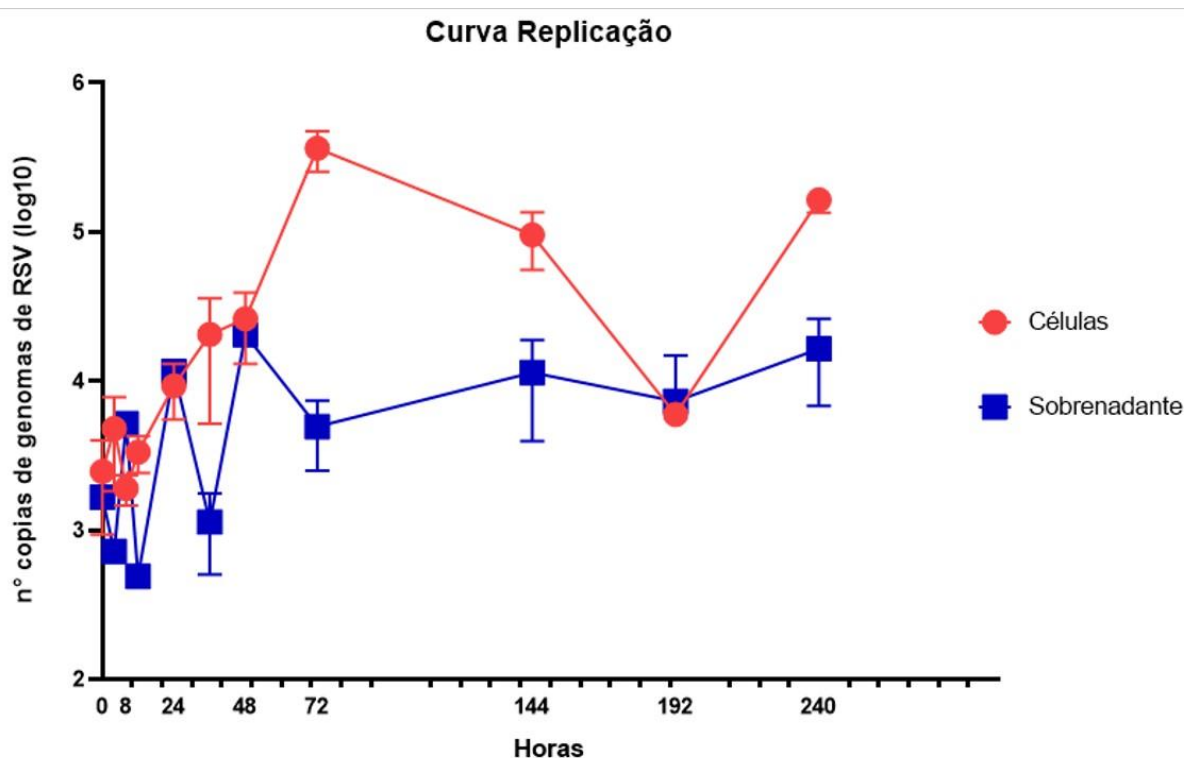


Figura 6. Curva de replicação do HRSV em células Jeko-1. Células e sobrenadante de culturas de células Jeko-1 infectadas por HRSV foram coletados. O genoma viral do HRSV foi quantificado por qPCR do pellet de células e do sobrenadante.

Considerando que há formação de estruturas semelhantes a fábricas virais de HRSV em células Jeko-1 (Figura 3), com acúmulo intracelular de RNA viral, mas sem produção mensurável de progênie no sobrenadante, decidimos verificar a produção dos RNAs mensageiros das proteínas virais. Para isso, em dois experimentos independentes, células Jeko-1 foram infectadas com HRSV (MOI=10) e 10 dias após a inoculação as células foram usadas para as dosagens. Aos 10 dias após a infecção, as células foram colhidas, marcadas para a presença de proteína viral N, e então separadas em células positivas e negativas. As subpopulações separadas por FACS tiveram o RNA total extraído utilizando o Kit Qiagen DNA/RNA (Allprep DNA/ RNA Mini Kit). O RNA total foi submetido a reação de transcrição reversa, utilizando primers de

oligo-dT, de modo a retrotranscrever somente os RNAm, e o produto da reação foi amplificado por qPCR SybrGreen usando primers específicos para cada proteína.

Como resultado foi possível observar que os RNAm virais mais expressos foram NS1 e SH, corroborando resultados anteriores do laboratório e da literatura, obtidos pela infecção por HRSV em células epiteliais. No entanto, não houve detecção perceptível de RNAm para a polimerase viral (L) em células Jeko-1 (Figura 7).

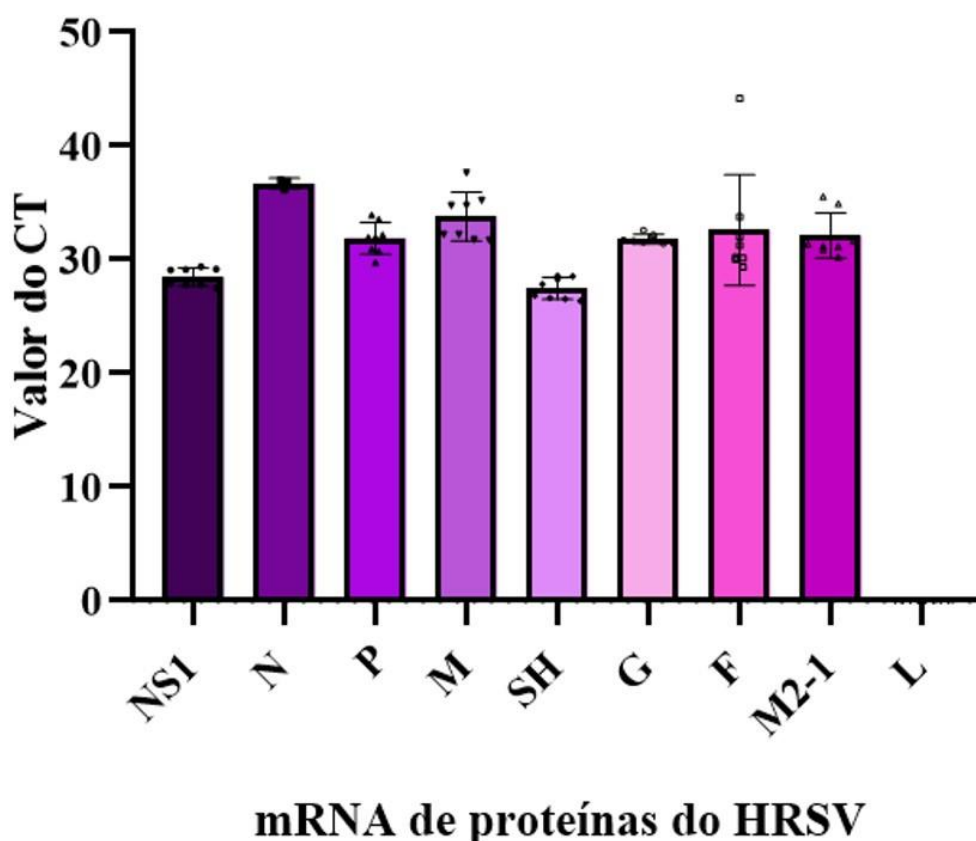


Figura 7. Detecção de RNAm de RSV. Valores de Ct da detecção dos RNAm de RSV em 10 dias pós-infecção na linhagem Jeko-1. Os RNAm mais abundantes foram os de NS1 e SH.

4.6 Alteração da capacidade de resposta com produção de citocinas em células Jeko-1 infectadas por HRSV.

Como a infecção por HRSV em células Jeko-1 não foi produtiva de progênie viral, e também não induziu morte celular significativa em células Jeko-1, com células Jeko-1 infectadas permanecendo viáveis por pelo menos 10 dias, nós, avaliamos se havia algum efeito no perfil de secreção de citocinas em células infectadas por HRSV. Às 72 horas e no 10º dia pós-inoculação, células Jeko-1 infectadas com HRSV foram

colhidas, centrifugadas, e o sobrenadante da cultura foi separado. Utilizando o Kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine, foram quantificadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ .

Notavelmente, células Jeko-1 infectadas com HRSV mostraram um aumento evidente na secreção de IL-10, IL-6 e TNF- α às 72 hpi, quando comparadas com células inoculadas com *mock*. Mesmo após 10 dias da infecção, ainda há considerável aumento de níveis de IL-10 e IL-6 (Figura 8). Embora o experimento tenha sido feito em uma cultura pura da linhagem celular Jeko-1, e não em uma cultura mista contendo toda a gama de células imunes, o forte aumento na secreção de IL-10, IL-6 e TNF- α induzida pelo HRSV é sugestivo de que o vírus causa efeitos profundos na expressão de genes codificantes de citocinas por linfócitos B.

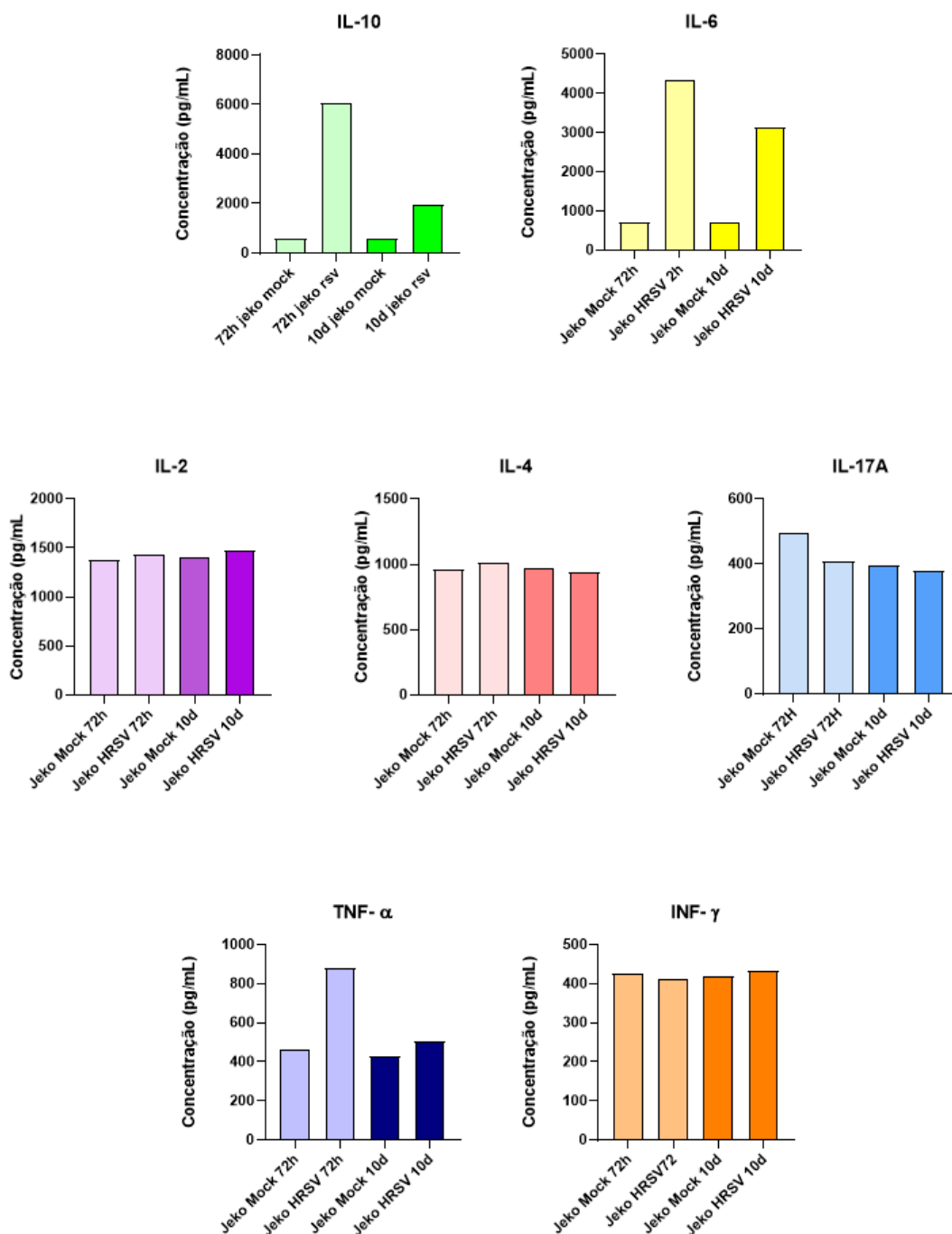


Figura 8. Quantificação de citocinas secretadas em células Jeko-1 infectadas com HRSV. Células Jeko-1 foram infectadas (MOI=1) e 72h e 10 dias após a infecção, os sobrenadantes foram separados e as citocinas secretadas foram dosadas utilizando o Kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine. É possível observar a alterações significativas na expressão de IL-10, IL-6 e TNF- α .

5 Discussão

O HRSV é uma das principais causas de IRA grave em crianças em todo o mundo, e praticamente todas as pessoas são infectadas nos primeiros dois anos de vida (CDC, 2017). O desenvolvimento de imunidade protetora a HRSV é incompleto e reinfecções são comuns, mas tornam-se progressivamente menos graves com a idade (36). No entanto, os idosos e as pessoas imunocomprometidas são particularmente suscetíveis a doenças mais graves por HRSV (36).

Foi surpreendente descobrir que o genoma do HRSV foi detectado em 17% dos tecidos tonsilares e secreções de crianças na ausência de sintomas atribuíveis ao HRSV (37). Esses resultados, juntamente com estudos realizados por outros grupos de pesquisa, têm implicações importantes para a epidemiologia do HRSV, pois portadores assintomáticos podem disseminar o vírus na comunidade (38,39). A esse respeito, vários estudos filogenéticos, incluindo dados de São Paulo, Brasil, apontaram a possibilidade de que a persistência do HRSV em algum possível hospedeiro desempenha um papel essencial na sua manutenção durante períodos inter-sazonais, com potencial para reintrodução autóctone em populações locais (29,40–43). Portanto, a possibilidade de que o HRSV possa persistir nos tecidos linfoepiteliais das amígdalas de crianças sugere que esses tecidos podem ser o reservatório inter-sazonal de onde ele pode ser eliminado. No entanto, resultados mais recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a infecção por HRSV de células linfóides não se restringe a tecidos tonsilares, uma vez que foi detectada por RT-PCR em 50% dos linfonodos cervicais e 29% dos linfonodos infra-diafragmáticos de pacientes adultos com hiperplasia benigna dos linfonodos, sem IRA (35). Além disso, estudos imuno-histoquímicos em série revelaram que a proteína HRSV foi detectada em folículos linfóides em associação com linfócitos B e CD4+T (35). Portanto, a presença de HRSV em células linfóides não se restringe aos tecidos linfóides secundários associados à mucosa respiratória, mas parece ser sistêmica(44). Essa situação lembra a história natural da latência de vírus de Epstein-Barr (EBV) em linfócitos B de memória em tecidos linfóides secundários, com subsequente ativação policlonal da produção de imunoglobulinas pelas células B infectadas, e ciclos recidivantes de infecção lítica ao longo da vida, permitindo a eliminação salivar do vírus infeccioso (45).

A infecção natural de células linfóides pelo HRSV incita a investigação da interação vírus-célula e suas possíveis consequências para as funções das células imunes infectadas, o que motivou o presente estudo. Encontramos proteína N do HRSV com formação de estruturas semelhantes a corpos de inclusão em linfócitos B naturalmente infectados obtidos de amígdalas de crianças com hipertrofia tonsilar, na ausência de sintomas de IRA relacionada ao HRSV no mês anterior à amigdalectomia. Esta descoberta sugere fortemente que a infecção natural de células B por HRSV pode ser produtiva. Curiosamente, um estudo encontrou infecção por HRSV em células B humanas purificadas do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos que tiveram bronquiolite grave por HRSV. Nesse estudo, as células B reguladoras neonatais (nBreg) foram mais frequentemente infectadas do que as células B maduras ou imaturas naïve (46).

A linhagem de células Jeko-1 de linfócitos B usada neste estudo, originalmente obtida de um linfoma de células do manto em um paciente de 78 anos, produz IgM, que é um marcador aceito de células B imaturas (47). Descobrimos que mais de 30% das células Jeko-1 em cultura foram infectadas por HRSV (MOI=1) nos primeiros dias de infecção, indicando que são suscetíveis ao vírus. A proteína HRSV N foi detectada por IF nas células, indicando que havia atividade viral suficiente para acumular proteínas virais em estruturas semelhantes a corpos de inclusão. Entretanto verificamos que praticamente não houve produção de progênie viral, indicando que as células Jeko-1 apresentam baixa permissividade à replicação de HRSV sem produção de progênie no sobrenadante. Se há alguma produção presente, esta não é detectável pelos métodos usados. É digno de nota que as estruturas semelhantes a corpos de inclusão em linfócitos B têm aspecto sugestivo de corpos de inclusão não funcionais, conforme previamente mostrado pelo nosso grupo para a infecção de células T de linhagem A3.01 (48), o que corrobora a existência de uma infecção improdutiva de linfócitos B.

É importante ressaltar que a infecção por HRSV não causou morte apreciável de células Jeko-1 em 24 horas, indicando que a infecção não era lítica mesmo após 72 horas e, portanto, linfócitos B poderiam abrigar o vírus por um certo período de tempo, até que sobrevenha a senescência celular. Se conseguirmos provar que este é o caso, e se validarmos os resultados em linfócitos B humanos primários de órgãos linfoides secundários, este sistema in vitro pode se tornar útil em experimentos futuros para

recapitular as características bioquímicas e virológicas da infecção de longo prazo de linfócitos B por HRSV. Será importante investigar se o HRSV infecta linfócitos B naives ou diferenciados e se torna a célula incapaz de proliferar. A natureza clonal da infecção natural é outra questão pendente a ser investigada no futuro.

Nossos resultados *in vitro* de quantificação de citocinas pró-inflamatórias indicaram que a infecção de células B pelo HRSV leva ao aumento de IL-6 e IL-10. Tal resultado sugere que a infecção de HRSV, apesar de pouco produtiva, pode induzir expressão dessas duas citocinas, especificamente. A IL-10, exerce funções imunossupressoras especialmente durante a resolução da fase de infecção e inflamação, tendo como alvo as respostas imunes tanto inata quanto adaptativa, minimizando o dano tecidual causado pelo excesso e descontrole de respostas inflamatórias efetoras (49). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que atua não só nas reações de fase aguda das infecções, mas também leva ao desenvolvimento de respostas imunológicas humoral e celular específicas, através da diferenciação de linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e a ativação de linfócitos T, tendo um papel importante como moduladora na transição das fases aguda e crônica da infecção (50).

As células B se diferenciam em plasmócitos e, durante sua diferenciação, funcionam como moduladores da resposta imune, dependendo das citocinas que secretam. Embora linfócitos B naives não secretem muitas citocinas, podem fazê-lo após a ativação e, à medida que se tornam capazes de produzir citocinas, podem regular as respostas. Além disso, os subtipos de células B efetoras Be1 e Be2 são de importância crítica para as respostas tipo I ou tipo II, uma vez que seus produtos desempenham papéis em mecanismos de regulação cruzada (51). Dependendo dos estímulos, as células B podem produzir IL-1(52), IL-5 (53), TNF- α , linfotóxina, IL-6, IL-10 (54,55) e IFN- γ (56). Tornou-se evidente que as células B desempenham importantes papéis reguladores do sistema imunológico e, portanto, a presença de infecção por HRSV em células B pode afetar diretamente a secreção de citocinas. Portanto, a descoberta da secreção aumentada das citocinas IL-6, IL-10 em células infectadas por HRSV em meio a um painel representativo de citocinas mesmo dez dias após a inoculação, é sugestiva de que a infecção por HRSV, ainda que improdutiva da progênie do vírus, pode afetar significativamente as funções reguladoras imunológicas de células B e outras células nos tecidos linfoides secundários.

Ao refletir sobre essa interação de HRSV e linfócito B no contexto de tonsilas humanas naturalmente infectadas pelo vírus, é tentador especular que a infecção de HRSV em célula B, fenótipo mais abundante residente de amígdalas e adenoides, pode promover a manutenção de um ambiente inflamatório facilitador da persistência viral (aumento de IL-10) bem como um ambiente facilitador da hiperplasia (aumento de IL-6). Se faz necessário validar tal hipótese por meio de experimentos *ex vivo* tal como a utilização de explantes de tonsilas humanas infectadas com HRSVA detecção de HRSV em tecido linfoide tonsilar varia de 7% a 17% (22,37,57–59). Além disso, os linfócitos B são importantes células apresentadoras de antígenos, e um linfócito B persistentemente infectado com HRSV em um órgão linfoide secundário poderia funcionar como um reforço da memória imunológica.

Em resumo, descobrimos que o antígeno de HRSV em linfócitos B de amígdalas naturalmente infectadas de crianças com hipertrofia amigdaliana na ausência de sintomas respiratórios agudos. O HRSV infecta culturas primárias de células linfomononucleares tonsilares inoculadas *in vitro*, como confirmado por IF, com formação de estruturas semelhantes a corpos de inclusão, mas sem produção mensurável de progênie por RT-PCR em tempo real. O HRSV infecta células B da linhagem Jeko-1, causando alterações morfológicas e agregação celular, mas sem morte celular significativa. Apesar do acúmulo de proteína N viral com formação de estruturas sugestivas de corpos de inclusão, não houve produção significativa da progênie de HRSV nas células Jeko-1, o que recapitula as observações em culturas de linfócitos B de amígdalas. A análise da detecção de um grupo selecionado de citocinas mostrou aumento de secreção para IL-6, IL-10 e ainda em fase aguda, de TNF- α , por células Jeko-1 infectadas, sugerindo que HRSV causa efeitos importantes na expressão gênica da célula hospedeira.

Em conclusão, o HRSV infecta os linfócitos B sem comprometer a viabilidade celular, com formação de estruturas semelhantes a fábricas virais, mas com baixa produção de carga viral no sobrenadante. Ao longo de 10 dias, apenas 4% dos linfócitos B encontram-se persistentemente infectados pelo HRSV, sendo que tal infecção aumenta a produção de citocinas IL-6 e IL-10, podendo contribuir para a manutenção do vírus persistente nessas células. Coletivamente, nossos dados de infecção *in vitro* de linfócitos B por RSV, são consistentes com a existência de infecção viral persistente por HRSV nestas células, levando em conta a susceptibilidade dos

linfócitos B, com pouca produção de progênie, sem afetar a viabilidade celular e elevando a expressão da citocina IL-10, marcador canônico de infecção viral persistente (60).

REFERÊNCIAS

1. Bates JT, Keefer CJ, Slaughter JC, Kulp DW, Schief WR, Crowe JE. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology* [Internet]. 2014;454–455(1):139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.010>
2. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, Simoes EAF, Madhi SA, Gessner BD, et al. Global, regional and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015. *The Lancet*. 2017;In Press:1–13.
3. Tabor DE, Fernandes F, Langedijk AC, Wilkins D, Lebbink RJ, Tovchigrechko A, et al. Global molecular epidemiology of respiratory syncytial virus from the 2017-2018 INFORM-RSV study. Vol. 59, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology; 2021.
4. Ghia C, Rambhad G. Disease Burden Due to Respiratory Syncytial Virus in Indian Pediatric Population: A Literature Review. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*. 2021 Jan;15:117955652110292.
5. Shang Z, Tan S, Ma D. Respiratory syncytial virus: From pathogenesis to potential therapeutic strategies. Vol. 17, *International Journal of Biological Sciences*. Ivyspring International Publisher; 2021. p. 4073–91.
6. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. *Paediatric Respiratory Reviews*. 2004;5(SUPPL. A).
7. Young M, Smitherman L. Socioeconomic Impact of RSV Hospitalization. Vol. 10, *Infectious Diseases and Therapy*. Adis; 2021. p. 35–45.

8. Ackerson B, Tseng HF, Sy LS, Solano Z, Slezak J, Luo Y, et al. Severe morbidity and mortality associated with respiratory syncytial virus versus influenza infection in hospitalized older adults. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Jul 2;69(2):197–203.
9. Pollack P, Grootuis JR. Development and use of palivizumab (Synagis): A passive immunoprophylactic agent for RSV. *Journal of Infection and Chemotherapy* [Internet]. 2002 Sep [cited 2016 Dec 2];8(3):201–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12373481>
10. Huang K, Incognito L, Cheng X, Ulbrandt ND, Wu H. Respiratory syncytial virus-neutralizing monoclonal antibodies motavizumab and palivizumab inhibit fusion. *J Virol*. 2010;84(16):8132–40.
11. Wang D, Bayliss S, Meads C. Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children: a systematic review and additional economic modelling of subgroup analyses. *Health Technol Assess*. 2011;15(5).
12. Chatterjee A, Mavunda K, Krilov LR. Current State of Respiratory Syncytial Virus Disease and Management. Vol. 10, *Infectious Diseases and Therapy*. Adis; 2021. p. 5–16.
13. Collins PL, Wertz GW. The envelope-associated 22K protein of human respiratory syncytial virus: nucleotide sequence of the RNAm and a related polytranscript. *J Virol*. 1985;54(1):65–71.
14. Rima B, Collins P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb RA, et al. ICTV virus taxonomy profile: Pneumoviridae. *Journal of General Virology*. 2017 Dec 1;98(12):2912–3.
15. Battles MB, McLellan JS. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nature Reviews Microbiology* [Internet].

2019;17(4):233–45. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0149-x>

16. Gan S-W, Tan E, Lin X, Yu D, Wang J, Tan GM-Y, et al. The small hydrophobic protein of the human respiratory syncytial virus forms pentameric ion channels. *J Biol Chem*. 2012 Jul 13;287(29):24671–89.
17. Money V a, McPhee HK, Mosely J a, Sanderson JM, Yeo RP. Surface features of a Mononegavirales matrix protein indicate sites of membrane interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(11):4441–6. Available from: <http://www.pnas.org/content/106/11/4441.abstract>
18. García J, Barreno BG, Vivo A, Melero J a. Cytoplasmic Inclusions of Respiratory Syncytial Virus-Infected Cells: Formation of Inclusions Bodies in Transfected Cells That Coexpress the Nucleoprotein, the Phosphoprotein, and the 22K Protein. Madrid: *Virology*; 1993.
19. Lambert DM. Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology*. 1988;164(2):458–66.
20. Lay MK, González PA, León MA, Céspedes PF, Bueno SM, Riedel CA, et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. *Microbes and Infection*. 2013;15(3):230–42.
21. Reena Ghildyal § #, Adeline Ho ‡, Kylie M. Wagstaff ‡, Manisha M. Dias ‡, Chenoa L. Barton ‡, Patricia Jans ‡, et al. Nuclear Import of the Respiratory Syncytial Virus Matrix Protein Is Mediated By Importin β 1 Independent of Importin α . *Biochemistry* [Internet]. 2005;44(38):12887–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi050701e>

22. Proença-Módena JL, Buzatto GP, Paula FE, Saturno TH, Delcaro LS, Prates MC, et al. Respiratory viruses are continuously detected in children with chronic tonsillitis throughout the year. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2014 Oct 1;78(10):1655–61.
23. Yamashita K, Ichimiya S, Kamekura R, Nagaya T, Jitsukawa S, Matsumiya H, et al. Studies of tonsils in basic and clinical perspectives: From the past to the future. Vol. 77, *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. S. Karger AG; 2016. p. 119–24.
24. Kato A, Hulse KE, Tan BK, Schleimer RP. B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2013 Apr;131(4):933–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674913003540>
25. Miyake MAM, Ramos CC, Venosa AR, Lima AS, Marone SAM. Mecanismos imunológicos da mucosa das vias aéreas superiores e fisiopatologia do anel linfático de Waldeyer: conceitos atuais. *@Rq Otorrinolaringol*. 2003;(1):143–50.
26. Berger A. Science commentary: Th1 and Th2 responses: What are they? *British Medical Journal*. 2000;321(7258):424.
27. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* [Internet]. 2015 Jul;74(1):5–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466614005390>
28. Kikkert M. Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. *Journal of Innate Immunity*. 2020;12(1):4–20.
29. Tripp RA. Review Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Infection. 2004;17(2):165–81.

30. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nature Medicine*. 2008 Jun;14(6):633–40.
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. eighth. Philadelphia: elsevier saunders; 2015. 1–547 p.
32. Flores EF. *Virologia veterinária* [Internet]. Santa Maria: UFSM. 2007. 888 p. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Virologia+veterin?ria#0>
33. Rico MÁ, Trento A, Ramos M, Johnstone C, Val M del, Melero JA, et al. Human respiratory syncytial virus infects and induces activation markers in mouse B lymphocytes. *Immunology and Cell Biology*. 2009;87(June 2014):344–50.
34. Valarcher J-F, Bourges-abella N, Roth M, Andreoletti O, Ave P, Schelcher F. Persistent Infection of B Lymphocytes by Bovine Respiratory Syncytial Virus difficult to explain . One reason may be the inapparent. *Viol*. 2001;291:55–67.
35. Lais Santos Jesus B de. Infecção de linfonodos humanos por vírus sincicial respiratório.
36. Singleton R, Etchart N, Hou S, Hyland L. Inability To Evoke a Long-Lasting Protective Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice Correlates with Ineffective Nasal Antibody Responses. *Journal of Virology*. 2003 Nov;77(21):11303–11.
37. Proenca-Modena JL, Pereira Valera FC, Jacob MG, Buzatto GP, Saturno TH, Lopes L, et al. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. *PLoS ONE*. 2012 Aug 3;7(8).

38. Proença-Módena JL, Buzatto GP, Paula FE, Saturno TH, Delcaro LS, Prates MC, et al. Respiratory viruses are continuously detected in children with chronic tonsillitis throughout the year. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2014;78(10):1655–61.
39. Advani S, Sengupta A, Forman M, Valsamakis A, Milstone AM. Detecting respiratory viruses in asymptomatic children. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2012 Dec;31(12):1221–6.
40. Collins PL, Melero J a. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res [Internet]*. 2011 Dec [cited 2016 Dec 2];162(1–2):80–99. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3221877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. Gomez B. Respiratory Syncytial Virus Persistence. *Virology & Mycology*. 2012;01(01).
42. Katzov-Eckert H, Botosso VF, Neto EA, Zanotto PMDA. Phylodynamics and Dispersal of HRSV Entails Its Permanence in the General Population in between Yearly Outbreaks in Children. *PLoS ONE*. 2012;7(10):1–11.
43. Proença-Módena JL, Buzatto GP, Paula FE, Saturno TH, Delcaro LS, Prates MC, et al. Respiratory viruses are continuously detected in children with chronic tonsillitis throughout the year. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2014;78(10):1655–61.
44. Shehata L, Wieland-Alter WF, Maurer DP, Chen E, Connor RI, Wright PF, et al. Systematic comparison of respiratory syncytial virus-induced memory B cell responses in two anatomical compartments. *Nature Communications*. 2019 Dec 1;10(1).

45. Kenney SC, Mertz JE. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. Vol. 26, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2014. p. 60–8.
46. Zhivaki D, Lim A, Zhang X, Lo-man R, Lim A, Morva A, et al. Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity Article Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Pr. *Immunity*. 2017;46:301–14.
47. Brière F, Dubois B, Fayette J, Vandenabeele S, Caux C, Banchereau J, et al. Growth of Activated. 2001;(Idc):255–61.
48. Cardoso RS, Tavares LA, Jesus BLS, Criado MF, de Carvalho AN, Souza J de P, et al. Host retromer protein sorting nexin 2 interacts with human respiratory syncytial virus structural proteins and is required for efficient viral production. *mBio*. 2020 Sep 1;11(5):1–23.
49. Ouyang W, O’Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. Vol. 50, *Immunity*. Cell Press; 2019. p. 871–91.
50. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. Vol. 28, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd; 2020.
51. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. 2009.
52. Matsushima K, Procopio A, Abe H, Scala G, Ortaldo JR, Oppenheim JJ. Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes. *J Immunol*. 1985 Aug;135(2):1132–6.
53. Paul CC, Keller JR, Armpriester JM, Baumann MA. Epstein-Barr Virus Transformed B Lymphocytes Produce Interleukin-5

[Internet]. Vol. 75, Blood. 1990. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/75/7/1400/1641271/1400.pdf>

54. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? *The Journal of Immunology*. 2004 Mar 15;172(6):3422–7.
55. Vazquez MI, Catalan-Dibene J, Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. Vol. 74, *Cytokine*. Academic Press; 2015. p. 318–26.
56. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN- γ Production by B Effector 1 Cells: Essential Roles for T-bet and the IFN- γ Receptor. *The Journal of Immunology*. 2005 Jun 1;174(11):6781–90.
57. Jartti T, Palomares O, Waris M, Tastan O, Nieminen R, Puhakka T, et al. Distinct regulation of tonsillar immune response in virus infection. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;69(5):658–67.
58. Yeshuroon-Koffler K, Shemer-Avni Y, Keren-Naus A, Goldbart AD. Detection of common respiratory viruses in tonsillar tissue of children with obstructive sleep apnea. *Pediatric Pulmonology*. 2015 Feb 1;50(2):187–95.
59. Drago L, Esposito S, de Vecchi E, Marchisio P, Blasi F, Baggi E, et al. Detection of respiratory viruses and atypical bacteria in children's tonsils and adenoids. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Jan;46(1):369–70.
60. Oldstone MBA. Anatomy of viral persistence. Vol. 5, *PLoS Pathogens*. 2009.