Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Rosa Maria Mendes Viana

**Estudo de infecções por vírus respiratórios e Papilomavírus
em tecido de colesteatoma primário**

Ribeirão Preto, 2020

Rosa Maria Mendes Viana

**Estudo de infecções por vírus respiratórios e Papilomavírus
em tecido de colesteatoma primário**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência.

Área de concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito

Co-orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda

Ribeirão Preto, 2020

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

Viana, R.M.M

Estudo de infecções por vírus respiratórios e Papilomavírus em tecido de colesteatoma primário.

Ribeirão Preto, 2020.

53 p.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientador: Hyppolito, Miguel Angelo

1. Colesteatoma. 2. Vírus respiratórios. 3. Orelha média. 4. Mastoidectomia

Rosa Maria Mendes Viana

“Estudo de infecções por vírus respiratórios e Papilomavírus em tecido de colesteatoma primário”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr
Julgamento

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr
Julgamento

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr
Julgamento

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr
Julgamento

Instituição:

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

E a palavra que define esse momento é **GRATIDÃO**.....

Primeiramente gostaria de agradecer a minha eterna saudade, minha mãezinha, **Maria Clarice Mendes Viana**, por mesmo não estando mais fisicamente no mundo terreno, se fez presente no meu coração e nos meus pensamentos todos os dias. Dedico mais essa conquista a senhora, mãezinha, porque sei o quanto ficaria feliz e com coração cheio de orgulho.

Ao **prof. Dr. Miguel Angelo Hyppolito**, pela orientação, paciência, onde mesmo sabendo que eu teria um pouco de dificuldade no projeto proposto, aceitou me orientar, e com toda a calma e bondade compartilhou seus conhecimentos, facilitando assim a minha trajetória.

Ao **prof. Dr. Eurico Arruda**, pela co-orientação, por tornar a realização desse projeto possível, pelo entusiasmo científico, por ser esse ser humano, admirável, competente e acima de tudo bondoso. Obrigada por todas as coisas que já fizeste por mim. Gratidão sempre!

Aos meus queridos amigos, **Juliano de Paula, Bruna Laís, Ariele Casseta e Danilo Melo**, pelo suporte e companherismo durante todo esse tempo.

Aos meus colegas do laboratório de Patogênese Viral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Centro de Pesquisa em Virologia, pela amizade, convívio e colaboração. Gratidão em especial a Maria Lúcia Silva (Pitty) que me ajudou nos cortes e preparo das lâminas para a realização da imunohistoquímica e SIMPLE, ao **Daniel Jorge e Ronaldo Martins** pelo suporte durante toda a execução do projeto.

Ao **prof. Dr. Fernando Chahud**, por ter nos cedido os blocos de tecido utilizado nesse projeto.

À FAPESP, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro, fundamental para realização deste trabalho.

RESUMO

Viana, R.M.M. **Estudo de infecções por vírus respiratórios e Papilomavírus em tecido de colesteatoma primário**. 2020. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O colesteatoma é um tumor destrutivo do ouvido médio que pode resultar em complicações importantes. A patogênese do colesteatoma não é conhecida em detalhes, e alguns fatores associados ao seu desenvolvimento têm sido identificados. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de vírus respiratórios e Papilomavírus em tecidos de colesteatoma primário por PCR e imunohistoquímica (IHQ). Os fenótipos celulares foram determinados pela técnica de SIMPLE (*Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing Method*). Para isso, foram testadas 26 amostras de tecidos de colesteatoma primário embebidas em parafina retirados de pacientes operados no Hospital da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. Das 26 amostras testadas, 9 (35%) foram positivas nesse tecido para rinovírus humano (HRV), enterovírus humano, metapneumovírus humano e bocavírus humano. Além da detecção de genoma por qPCR, também foi possível nesse tecido detectar proteína viral e determinar fenótipos celulares que apresentavam marcação positiva para HRV, HEV e HPMV. Os fenótipos celulares incluíram: linfócito T cd8+, linfócito T cd4+, linfócito B, macrófagos, células dendríticas, fibroblasto e células epiteliais. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo de detecção de vírus respiratórios em tecidos de colesteatoma primário. Os vírus detectados nesse estudo foram os mesmos detectados em um estudo prévio com lavado de otite média com efusão de crianças que foi realizado em colaboração com o nosso grupo de pesquisa. Com os nossos achados podemos concluir que o tecido de colesteatoma primário pode ser um sítio de infecção para esses vírus respiratórios e que talvez a presença deles possa refletir na patogênese da doença.

Palavras chaves: Colesteatoma, vírus respiratórios, orelha média, mastoidectomia.

ABSTRACT

Viana, R.M.M. Infections of primary cholesteatoma tissue by respiratory viruses and Papillomavirus. 2020. Master's dissertation - University of São Paulo School of Medicine, Ribeirão Preto, 2020.

Cholesteatoma is a destructive tumor of the middle ear that can result in major complications. The pathogenesis of cholesteatoma is still poorly understood, but research has contributed to elucidating some factors. The aim of this study was to investigate the presence of respiratory viruses and papillomaviruses in primary cholesteatoma tissues by PCR and immunohistochemistry (IHC). Additionally, cellular phenotypes were determined using the SIMPLE (Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing Method) technique, allowing to identify which cells in these tissues are susceptible to infection by the viruses under study. To this end, 26 samples of paraffin-embedded primary cholesteatoma tissues from patients undergoing mastoidectomy at the University of São Paulo Clinics Hospital, Ribeirão Preto, were tested. As results, we identified 9 (35%) positive samples by detecting viral genome of human rhinovirus, human enterovirus, human metapneumovirus and human bocavirus using qPCR. In addition to the genome detection, we detected viral proteins and identified cellular phenotypes that showed positive staining for HRV, HEV and HPMV. These cellular phenotypes included T CD8+, T CD4+ and B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, fibroblasts and epithelial cells. As far as we know, this is the first report of respiratory viruses detection in primary cholesteatoma tissues. Interestingly, the viruses found in our samples were the same ones detected in middle ear fluids of children with otitis media in a previous work carried out in collaboration with our research group. With our findings, we can conclude that the primary cholesteatoma tissue may be an infection site for respiratory viruses, opening questions about the consequences of these infections in the pathogenesis of the disease.

Keywords: cholesteatoma, respiratory viruses, middle ear, mastoidectomy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunohistoquímica para a proteína estrutural de HEV, HMPV e HRV em tecido de colesteatoma primário	35
Figura 2. Marcação sequencial para proteína estrutural de HRV e fenótipos celulares ..	37
Figura 3. Marcação sequencial para proteína estrutural de HEV e fenótipos celulares ..	38
Figura 4. Marcação sequencial para proteína estrutural de HMPV e fenótipos celulares.....	39
Figura 5. Eletroforese horizontal em gel de agarose 2% da segunda PCR (Nested) para a obtenção do produto para o sequenciamento	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers e sondas utilizados para a detecção dos vírus respiratórios por PCR em tempo real	27
Tabela 2. Primers PGMY09/11 utilizados para a detecção de HPV por PCR e posterior tipagem de HPV por hibridação reversa em linha	29
Tabela 3. Reagentes da PCR para a detecção de HPV	29
Tabela 4. Parametros de ciclagem do HPV	30
Tabela 5. Detecção viral em tecido de colesteatoma primário	34

LISTA DE SIGLAS

HPV	papilomavírus humano
OMC	otite média crônica
HEV	enterovírus humano
HRV	rinovírus humano
HMPV	metapneumovírus humano
hRSV	vírus sincicial respiratório
FLU	influenza
HPIV	parainfluenza
HCoV	coronavírus
HAdV	adenovírus
HBoV	bocavírus
PV	papilomavírus
Kb	quilobar
IHQ	imunohistoquímica
PCR	reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
PBS	phosphate buffered saline
BSA	albumina sérica bovina

PCR	reação em cadeia da polimerase
SIMPLE	Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Colesteatoma: conceito, classificação e características	15
1.2 Vírus respiratórios	17
1.2.1 Vírus Sincicial Respiratório e Metapneumovírus humano	17
1.2.2 Rinovírus e Enterovírus humanos	18
1.2.3 Influenza vírus A e B	18
1.2.4 Parainfluenza 1, 2, 3 e 4	19
1.2.5 Coronavírus	19
1.2.6 Adenovírus	20
1.2.7 Bocavírus	20
1.3 Papilomavírus Humano	21

2. OBJETIVOS

2.1 ObjetivosGeral	24
2.2 Objetivos específicos	24

3. MATERIAIS E MÉTODOS .....

3.1 Descrição do estudo, amostras e pacientes	26
3.2 Extração de ácidos nucleicos e detecção de genoma por qPCR	26
3.3 Imunohistoquímica para a detecção das proteínas virais de HMPV	30
3.4 Imunohistoquímica para a detecção das proteínas virais de HRV e HEV.....	31
3.5 Imunohistoquímica sequencial (SIMPLE) para proteínas virais e para marcadores de fenótipos celulares	31
3.6 Determinação de espécies de picornavirus por sequenciamento	32

4. RESULTADOS

4.1 Detecção viral	34
4.2 Detecção de proteínas virais <i>in situ</i>	34
4.3 Determinação dos fenótipos de células positivas para HMPV, HEV e HRV	36
4.3.1 Imunofenotipagem de células positivas para HRV no tecido de colesteatoma.....	36
4.3.2 Imunofenotipagem de células positivas para HEV no tecido de colesteatoma.....	38

4.3.3 Imunofenotipagem de células positivas para HMPV no tecido de colesteatoma.....	30
4.4 Determinação de espécie de picornavírus presentes em tecido de colesteatoma primário.....	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Colesteatoma: conceito, classificação e características

Colesteatomas são tumores de natureza benigna formados a partir da proliferação anormal de células epiteliais queratinizadas na orelha média, osso da mastóide e estruturas adjacentes. O termo colesteatoma (cole - colesterol; esteato – gordura; oma - tumor) foi primeiramente utilizado pelo anatomista alemão Johannes Muller em 1838, referindo-se à descrição inicial de um tumor formado por tecido gorduroso e cristais de colesterol. No entanto, esse termo revelou-se inadequado, visto que colesteatomas não têm cristais de colesterol ou gordura, mas sim epitélio do tipo estratificado queratinizado. Além disso, foram observadas células de Langerhans em maior quantidade do que na epiderme normal, grânulos querato-hialinos, tecido conjuntivo contendo fibras de colágeno, fibrócitos e células inflamatórias (SWARTZ, 1984 ; MANFREDI e SILVA, 2001; PEREIRA et al., 2002). Outras denominações também atribuídas a esse tumor, como tumor peroláceo, margaritoma, colesteatoma epidérmico e queratoma (DEVANEY et al., 1997).

Apesar do colesteatoma ser de natureza benigna e causar na maioria das vezes quadro clínico brando, em alguns casos pode ser observada agressividade com destruição óssea, podendo levar a complicações intracranianas (abscessos extradurais, subdurais, cerebrais, meningite otogênicas) e extracranianas (paralisia facial periférica, fístula perilinfática, mastoidite, labirintite infecciosa, abscesso periosteal e petrosite) (CHOLE, 2015).

Tradicionalmente o colesteatoma é classificado em congênito ou adquirido, e os adquiridos são subdivididos em primários ou secundários (MILEWSKI et al., 1998). Existem algumas teorias acerca da formação dos diferentes tipos de colesteatomas. Segundo a teoria de Michaels 1896 o colesteatoma congênito origina-se no momento do fechamento da tuba neural, quando o ectoderma fica preso no osso temporal, com ausência de perfuração da membrana timpânica, sem indícios de infecção prévia, e afetando apenas crianças (LEMMERLING e DE FOER, 2004; SEMAAN e MEGERIAN, 2006; NEVOUX et al., 2010). Para o colesteatoma adquirido primário são apontadas duas teorias para a sua formação: (1) Teoria do *continuum*: subseqüentes otites ou otites maltratadas gerariam microrrupturas na mucosa da orelha média, com quadro inflamatório, descamação epitelial e acúmulo de queratina. (2) Teoria da invaginação: uma invaginação da membrana timpânica decorrente de um distúrbio prévio da tuba

auditiva ocasionaria o estreitamento das estruturas anatômicas da orelha média com comprometimento da migração epitelial e limpeza de queratina, proliferação de patógenos, recrutamento de células inflamatórias e produção de citocinas (WENDT, 1973; WITTMAACK, 1933). Enquanto que o colesteatoma adquirido secundário é assim denominado por ser resultado de uma perfuração marginal ou central prévia da membrana timpânica que facilitaria a migração da epiderme do meato para o interior da orelha média, além da ação de outros fatores, como a presença de abundante quantidade de tecido de granulação na cavidade timpânica, sob estímulo inflamatório e infeccioso crônico.

Existem algumas teorias de formação do colesteatoma, no entanto, a sua etiologia ainda permanece desconhecida. Alguns estudos tem sugerido que a queratina continuamente produzida pelo epitélio, poderia criar um ambiente propício para a proliferação de bactérias e fungos, e a infecção microbiana persistente resultaria em uma resposta imunoinflamatória incessante, com proliferação de vasos sanguíneos e hiperplasia epitelial (COSTA et al, 1992; LEPERQUE e LEIGH, 2015; NEVOUX et al., 2010).

Alguns estudos têm adicionalmente avaliado a produção de citocinas, fatores pró-inflamatórios, fatores de crescimento epidérmico e fatores de crescimento causadores de transformação, tentando correlacioná-los com a patogênese do colesteatoma, mas correlações específicas com algum desses fatores individualmente são difíceis de estabelecer (BROWNING, 1997).

Histologicamente o colesteatoma apresenta-se como hiperplasia papilar escamosa bem característica e células coilocíticas, ou seja, células abauladas, vacuolizadas com núcleo localizado na periferia, característica morfológica que sugere infecção por papilomavirus (HPV) (FEREKIDIS et al., 2006).

Estudos de detecção de vírus em tecidos de colesteatoma atualmente são escassos na literatura, os poucos existentes são acerca de HPV, isso devido os achados histológicos e a capacidade desse vírus induzir hiperplasia celular nos tecidos nas quais eles infectam. No entanto a frequência de detecção é baixa. Em estudos como de Chao e colaboradores (2000) onde foram testadas 32 amostras de colesteatoma, apenas uma positivou para HPV-6 e de Franz e colaboradores (2007), de 20 amostras testadas apenas uma foi positiva para HPV.

Segundo uma das teorias de formação do colesteatoma adquirido primário, a teoria do *continuum*, as otites médias seria um dos fatores predisponentes para a

formação do tumor. Em estudos de detecção de genoma de vírus em secreções de otites médias já foi observado a presença de vírus respiratórios.

A otite média crônica (OMC) caracteriza-se por um processo inflamatório crônico que atinge a mucosa de revestimento da orelha média, e estudos demonstram uma possível correlação com o desenvolvimento do colesteatoma. Em estudo prospectivo de Schmidt Rosito e colaboradores (2017) realizado com 1.710 pacientes com OMC, 419 (24,5%) desenvolveram colesteatoma, reforçando uma possível associação. Infecções do trato respiratório superior que podem causar disfunção da tuba auditiva podem estar envolvidas na origem da OMC. A tuba auditiva comunica a orelha média à nasofaringe, tendo como função equilibrar a pressão da orelha média com a pressão do ambiente e favorecer a drenagem de secreções da orelha média para a nasofaringe (BLUESTONE, 2004). Buzzato e colaboradores (2017) estudaram o perfil de patógenos em secreções de otite média com efusão em crianças, e encontraram positividade para alguns vírus respiratórios, como enterovírus humano, rinovírus humano, metapneumovírus humano, e bocavírus humano.

Considerando os estudos de detecção de vírus respiratórios em secreções de otites médias existentes na literatura e o possível papel dessas otites na formação do colesteatoma, o presente trabalho procurou também investigar a presença de vírus respiratórios nos colesteatoma primários.

1.2 Vírus respiratórios

1.2.1 Vírus Sincicial Respiratório e Metapneumovírus humano

O hRSV e hMPV são pertencentes a família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae* e gênero *Pneumovírus* e *Metapneumovírus*, respectivamente. O hRSV foi descrito em 1956 e isolado a partir de uma colônia de chimpanzés (COLLINS e CROWE, 2007), enquanto que o hMPV foi descrito pela primeira vez em Holanda, em 2011. O hMPV apresenta um efeito citopático semelhante ao do hRSV, com formação de sincício, seguido pelo rápido rompimento das células e deslocamento da placa de cultura em infecções *in vitro*.

O vírus de hRSV e hMPV são pleomórficos, envelopados, com genoma composto de RNA fita simples de sentido negativo com cerca de 15Kb e 13 Kb respectivamente. O genoma hRSV codifica para 11 proteínas (duas não-estruturais e nove estruturais), enquanto que o hMPV para nove proteínas. As duas proteínas não-estruturais são a NS-1

e NS-2 codificadas apenas pelo genoma de hRSV. As proteínas estruturais codificadas por ambos os genomas dos vírus são: as proteínas superfície, F, G e SH, as proteínas de Matriz, M e M2, as proteínas do nucleocapsídeo, N, P e L (ARNOTT et al., 2011).

1.2.2 Rinovírus e Enterovírus humanos

Os HRV e HEV são pertencentes a família *Picornaviridae*, gênero *Enterovírus*. O HRV foi isolado pela primeira vez em 1956 quando se tentava determinar a etiologia de um resfriado comum. Os pesquisadores Pelon e Price inocularam secreções da nasofarínge de pessoas com resfriado comum em cultura de célula obtidas de tecido hepático de macaco *Rhesus* (PRICE et al., 1956; PELON et al., 1957). O gênero *enterovírus* é dividido em quinze espécies de vírus, três de HRV (RV-A a RV-C) e doze espécies de HEV não HRV (HEV-A a HEV-L). Embora as espécies de HRV e HEV serem semelhantes em nível molecular, apresentam diferenças quanto ao seu tropismo. Enquanto o HRV infecta principalmente o trato respiratório superior, o HEV infecta principalmente células do trato gastrointestinal, podendo causar quadros que variam desde uma doença febril a encefalite, miocardite e meningite viral. Os enterovírus, especialmente das espécies C e D são encontrados apenas no trato respiratório causando infecção com sintomas semelhantes a HRV (ROMERO et al., 2003 e TAPPAREL et al., 2013).

Os HRV e os HEV apresentam diâmetros em torno de 30nm, capsídeo icosaedro, não-envelopados, genoma de RNA fita simples e sentido positivo. O capsídeo viral é composto pelas proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4. O VP1 por localizar no lado externo do capsídeo, acredita-se ser o principal alvo da resposta imune. Enquanto a VP4 localiza-se na parte interna e interage com o genoma (MC LEAN et al., 2012).

1.2.3 Influenza vírus A e B

O vírus da influenza, conhecido como vírus da gripe pertencente a família *Orthomyxoviridae*, gênero influenza A, B, C e D. A subdivisão nos tipos A, B, C e D baseia-se nas diferenças antigênicas da nucleoproteína (NP) e a proteína de matriz (M1) (Palese, 2007). O vírus influenza A foi isolado pela primeira vez em 1933 por Wilson Smith. Sete anos depois Frans e colaboradores isolaram um outro vírus, que ficou sendo do grupo B. O Influenza do tipo C foi isolado em 1950 por Taylor. Os vírus são responsáveis por grandes pandemias, e isso é devido as variações antigênicas e mutações no genoma. Os genes que codificam a hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) são usados para classificação dos vírus e durante uma co-infecção com dois tipos de

influenzas distintos podem também sofrer *reassortment* e originar um “novo” vírus (KESSON, 2007).

Os vírus influenza podem ser esféricos ou filamentosos, envelopados, genoma de RNA fita simples e sentido negativo. Contém 8 segmentos que codificam para 10 proteínas que são: as glicoproteínas (HA e NA), proteína transmembrana (M2), proteína de matriz (M1), complexo ribonucleoproteico (RNP), polimerases virais (PB1, PB2 e PA), proteína de exportação (NEP) (PALESE, 2007).

1.2.4 Parainfluenza 1, 2, 3 e 4

O vírus parainfluenza humano pertence à família *Paramixoviridae*, subfamília *Paramixovirinae*, estando as espécies HPIV1 e HPIV3 no gênero *Respirovírus* e as espécies HPIV 2 e HPIV4a e 4b no gênero *Rubulavírus*. O primeiro isolamento de parainfluenza humano ocorreu em 1956 a partir de crianças com doenças respiratórias (CHANOCK et al., 1958). O termo parainfluenza foi criado devido à natureza da infecção respiratória e as propriedades das partículas virais, como o envelope viral e as glicoproteínas HA e NA apresentarem uma forte relação com o vírus influenza (ANDREWES et al., 1959).

Os vírus parainfluenzas são pleomórficos com diâmetro variando entre 150 a 200nm, envelopados, genoma de RNA fita simples não-segmentado e sentido negativo. O envelope é composto por uma bicamada lipídica e glicoproteínas. O nucleocapsídeo é composto pelo genoma, ribonucleoproteína (RNP) e outras proteínas, como a fosfoproteína (proteína P) e a proteína *Large* (proteína L). A RNP, proteína P e a proteína L, são responsáveis pela atividade da RNA polimerase dependente de RNA (MORGAN et al., 1968; STOREY et al., 1984; HARRISON et al., 2010)

1.2.5 Coronavírus

Os HCoV que infectam humanos são pertencentes a família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Coronavírus*. Com base em propriedades moleculares e sorológicas, o gênero *Coronavírus* é subdividido em três grupos principais (SPAAN et al., 1988). Cada grupo inclui HCoV que infectam humanos, animais e aves. O grupo I encontra-se os HCoV-229E e HCoV-NL63, e outros coronas que infectam animais, no grupo II, o HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-HCoV, SARS-HCoV-2, e coronas que infectam animais, e no grupo III encontra-se os que infectam aves (GORBALENYA et al., 2004).

O primeiro isolamento de HCoV ocorreu em 1965 de uma criança inglesa que apresentava sintoma de resfriado (TYRREL et al., 1965). A primeira descrição de surto causada por HCoV ocorreu na China em 2002, e devido a sua capacidade de causar doenças em grupos familiares e profissionais da saúde ficou conhecida como pneumonia infecciosa atípica (ZHONG et al., 2003; XU et al., 2004). A primeira pandemia descrita ocorreu em 2003, onde atingiu mais de 25 países, infectando mais de 8.000 indivíduos e 776 óbitos (PEIRIS et al., 2004).

O HCoV são vírus envelopados com cerca de 100 - 160 nm de diâmetro, genoma de RNA fita simples e polaridade positiva (LAI et al., 1997).

1.2.6 Adenovírus

Os HadV humanos são pertencentes a família *Adenovirinae* e gênero *Mastadenovírus*. Em 1953, o HadV foi isolado pela primeira vez por Rowe e colaboradores, enquanto estudavam o crescimento de Poliomavírus em tecido de adenoide. O termo adenovírus refere-se ao órgão na qual o vírus foi isolado pela primeira vez. No estudo o agente transmissível identificado era capaz de causar efeito citopático na ausência de Poliomavírus (ENDERS et al., 1956).

Os HAdV são patógenos que podem causar infecções respiratórias, gastrointestinal, urogenital e ocular. Atualmente são divididos em 7 espécies (HAdV-A a HAdV-G) e 86 sorotipos (KAJAN et al., 2018). As definições dos sorotipos foram feitas com base em teste de neutralização com anticorpos específicos (WOLD, 2007).

Os HAdV apresentam diâmetro em torno de 90 nm, capsídeo icosaedro, não-envelopados, genoma de DNA fita dupla de aproximadamente 34-48 kb (RUSSELL, 2000). Pelo menos nove proteínas compõe o capsídeo viral: Proteína II (proteína formadora do hexon), proteína III (proteína do penton), proteína IV (proteína da fibra), e as proteínas IIIA, VI, VIII e IX, proteínas V, VII, μ e proteína terminal TP, que estão no core junto com o genoma (VELLINGA et al., 2005).

1.2.7 Bocavírus

O HboV é pertencente a família *Parvovirinae*, gênero *Bocavírus*. O vírus foi descrito pela primeira vez na Suécia, em 2005, por pesquisadores que estudavam amostras de swabs e lavados nasofaríngeos de crianças com infecções do trato respiratório não resolvidas. Por sequenciamento e análise da árvore filogenética foi observado que essas infecções eram causadas por HboV (ALLANDER et al., 2005).

Os HboV apresentam diâmetro entre 18 a 26 nm, icosaedro, não-envelopado, genoma de DNA fita simples. O genoma contém a sequência que codifica as proteínas não-estruturais NS1 e NP1, as proteínas estruturais constituintes do capsídeo viral, a VP1 e VP2. Pelo fato dos genes que codificam as proteínas VP1 e VP2 apresentarem uma maior heterogeneidade genica, que são alvos nas análises filogenéticas do vírus (ZHI et al., 2006; GURDA et al., 2010).

1.3 Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus (PV) são vírus pertencentes a família *Papillomaviridae*. A classificação dos PV em gênero, espécies e tipos são realizados com base na homologia da sequência nucleotídica do gene L1 do vírus (DE VILLIERS et al., 2004). Atualmente são descritos 39 gêneros, sendo que os Papilomavírus que infectam humanos (HPV) pertencem aos gêneros *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (ICTV, 2016). Dentro de um mesmo gênero as espécies diferentes compartilham 60% a 70% de similaridade e tipos que pertencem a mesma espécie compartilham de 71% a 89% (BERNARD et al., 2010).

A classificação dos PVs baseado na homologia da sequência nucleotídica do genoma, as diferenças evolutivas entre os gêneros, de certa maneira, se correlacionam com tropismo celular (pele ou mucosa) e as lesões causadas (benigna ou maligna) pelos diferentes vírus (DE VILLIERS, 2004).

Devido a capacidade que alguns tipos de HPVs apresentam de desenvolver câncer, estudos relacionados a esse vírus têm sido constantemente desenvolvidos. Atualmente mais de 200 tipos de HPVs foram identificados. São classificados de acordo com a capacidade de causar lesões graves, em HPVs de alto risco: (HR-HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) associados a um risco relativamente elevado de desenvolvimento de câncer, e “baixo risco” (LR-HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), associados a proliferações epiteliais benignas. Existem também aqueles que são classificados como prováveis cancerígenos (HPV-26, 53, 66, 73 e 82) por apresentar uma relação filogenética próxima com os tipos cancerígenos conhecidos, e os de risco indeterminado (IH-HPV 2a, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90 e 91), onde a oncogenicidade ainda não é totalmente conhecido (MUÑOZ et al., 2006).

Os HPVs são pequenos vírus, com diâmetro em torno de 55 nm, icosaedros, não-envelopados (HOWLEY et al., 2007). São vírus de DNA fita dupla circular, com cerca

de 8000 pares de base (pb). O genoma do vírus é dividido em três regiões: (1) região não codificadora (long control region- LCR), que apresentam elementos reguladores da transcrição e replicação viral; (2) região precoce E (early region) que codifica várias proteínas - E1, E2, E4, E5, E6 e E7 – que regula a transcrição, replicação viral e controlam o ciclo celular, conferindo ao vírus a capacidade de transformar e imortalizar as células nas quais eles infectam; (3) região tardia (late region), envolvida no empacotamento do DNA, estruturação do vírion (WILSON et al., 2002; ZHENG e BAKER, 2006).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de vírus respiratórios e Papilomavírus em tecidos de colesteatoma primário, mediante os objetivos específicos.

2.2 Objetivos específicos

- 1.** Avaliar por PCR a detecção de um painel de vírus respiratórios e Papilomavírus em 26 amostras de tecido de colesteatoma primário, fixados e incluídos em blocos de parafina, constantes do arquivo dos serviços de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- 2.** Detectar in situ a presença de proteínas virais por imunohistoquímica (IHQ) em tecidos que se revelarem positivos por PCR.
- 3.** Determinar os fenótipos celulares que poderiam estar sediando a infecção por esses vírus.
- 4.** Determinar os genótipos virais por sequenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

---

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do estudo, amostras e pacientes

Trata-se de um estudo descritivo baseado na análise de amostras de colesteatoma primário embebidas em parafina fornecidas pelo Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo. Os resultados apresentados são baseados na análise de 26 amostras parafinadas obtidas de pacientes submetidos a mastoidectomia nos períodos de setembro de 2016 a setembro de 2017. Das 26 amostras, 15 foram obtidas de pacientes do sexo feminino e 11 de pacientes do sexo masculino, idade entre 13 a 71 anos (média: 37 anos). Todos os pacientes incluídos no estudo não apresentavam sinais e sintomas de doença respiratória aguda no momento ou pelo menos quatro semanas antes da cirurgia. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) Número (2.639.046/2018).

3.2 Extração de ácidos nucleicos e detecção de genoma por qPCR

Amostras de tecidos de colesteatoma primário embebidas em parafina foram submetidas a cortes de 10 µm para extração de ácidos nucleicos. O RNA foi extraído utilizando aproximadamente 750 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo as recomendações do fabricante, enquanto que para a extração de DNA utilizou-se o protocolo padronizado no laboratório (PIKOR et al., 2011). Para garantir a presença de material amplificável, as amostras foram testadas com primers específicos para B-actina e GAPDH (Tabela 1). As amostras que amplificaram para os controles endógenos foram analisadas quanto a presença de genoma para os vírus respiratórios e Papilomavírus.

A detecção de genoma dos vírus respiratórios adenovírus (HAdV), bocavírus (HboV), rinovírus (HRV), enterovírus (HEV), vírus sincicial respiratório humano A e B (HRSV), metapneumovírus A e B (HMPV), vírus influenza humano A e B (Parafluenza (HPIV) 1 e 3, coronavírus OC43 229E (HCoV) foram feitos pelo método Taqman real time (qPCR), utilizando primers e sondas específicos (Tabela 1). Antes da qPCR, para os vírus de RNA (HRV, HEV, HRSV, HMPV, HPIV, HCoV) foi realizado a transcrição reversa usando 1 µg de RNA total, primer random hexâmeros e Multiscribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo o protocolo

proposto pelo fabricante. Todas as reações de qPCR foram realizadas conforme descrito por PROENCA-MODENA et al., 2012. Assim, cada reação foi preparada para um volume final de 10 µl: 3 µl de cDNA, 10 mM de primer forward e primer reverso, 5 mM de sonda, 5 µl do master mix Taqman (Applied Biosystems), e os seguintes parâmetros: 95°C por 10 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, exceto quando os alvos foram o FLU A, HEV e o HMPV A e B, que os parâmetros foram: 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Para os vírus de DNA (HadV e HboV), utilizou-se 300 ng do DNA extraído e a reação 10 mM de primer forward e primer reverso, 5 mM de sonda, 5 µl do master mix Taqman (Applied Biosystems) e os mesmos parâmetros de ciclagem dos vírus de RNA.

Tabela 1. Primers e sondas utilizados para a detecção dos vírus respiratórios por PCR em tempo real.

Vírus ou Gene endógeno	Primer	Sequência 5'-3'	Referência
HRSVA	A21	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	[29]
	A102	TGCTCCGTTGCATGGTGTATT	
	APB48	FAM/ACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTC/TAMRA	
HRSV B	B17	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	[29]
	B120	TGTCAATATTATCTCTGTACTACGTTGAA	
	BPB45	JOE/TGATACATTAAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCCA/TAMRA	
FLUA	Forward	GACCRATCCTGTCACCTCTGAC	[9]
	reverse	AGGGCATTYTGACAAAKCGTCTA	
	Sonda	FAM/TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG/BHQ1	
FLUB	INFB-1	AAATACGGTGGATTAAATAAAAGCAA	[18]
	INFB-2	CCAGCAATAGCTCCGAAGAAA	
	INFB sonda	JOE/CACCCATATTGGGCAATTTCTATGGC/TAMRA	
HRV	Forward	GCACTTCTGTTTCCCC	[15]
	reverse	GGCAGCCACGCAGGCT	
	Sonda 1	FAM/AGCCTCATCTGCCAGGTCTA/MGB	
	Sonda 2	VIC/AGCCTCATCGACCAAACTA/MGB	
	HMPVA for	GCCGTTAGCTTCAGTCAATTCAA	
	HMPVA rev	TCCAGCATTGTCTGAAAATTGC	

HMPV	Sonda A	FAM/CAACATTTAGAAACCTTCT/MGB	[32]
	HMPVB for	GCTGTCAGCTTCAGTCAATTCAA	
	HMPVB rev	GTTATCCCTGCATTGTCTGAAAACT	
	Sonda B	FAM/CGCACAAACATTTAGGAATCTTCT/MGB	
HAdV	Forward	GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT	[27]
	Reverse	GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC	
	Sonda	FAM/TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA/TAMRA	
HBov	Forward	GCACAGCCACGTGACGAA	[43]
	Reverse	TGGACTCCCTTTTCTTTGTAGGA	
	Sonda	JOE/TGAGCTCAGGGAATATGAAAGACAAGCATCG/TAMRA	
HPIV1	Forward	ACAGATGAAATTTTCAAGTGCTACTTTAGT	[33]
	Reverse	GCCTCTTTTAATGCCATATTATCATTAGA	
	Sonda	FAM/ATGGTAATAAATCGACTCGCT/MGB	
HPIV3	Forward	CTCGAGGTTGTCAGGATATAG	[23]
	Reverse	CTTGGGAGTTGAACACAGTT	
	Sonda	FAM/AATAACTGTAAACTCAGACTTGGTACCTGACTT/TAMRA	
HCov-229E	Corona F3	TGGCGGGTGGGATAATATGT	[34]
	Corona R3	GAGGGCATAGCTCTATCACACTTAGG	
	Corona P2	VIC/ATAGTCCCATCCCATCAA/MGB	
HCov-OC43	Corona FOC	CCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTAC	[34]
	Corona ROC	AATACGTAGTAGGTTTGGCATAGCAC	
	Corona POC	FAM/CACACTTAGGATAGTCCCA/MGB	
HEV	Forward	GCGGAACCGACTACTTTGGG	[53]
	Reverse	CTCAATTGTCACCATAAGCAGCC	
	Sonda	FAM/TCCGTGTTTCCTTTTATTCTTATAC/MGB	
β-actin	Forward	CCCAGCCATGTACGTTGCTA	[46]
	Reverse	TCACCGGAGTCCATCACGAT	
	Sonda	VIC/ACGCCTCTGGCCGTACCACTGG/TAMRA	
GAPDH	Forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	[58]
	Reverse	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	

A detecção do genoma dos HPVs de baixo risco (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89), e de alto risco (HPV- 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) foram feitos pelo método PCR convencional utilizando dois conjuntos de primers PGMY09/11(GRAVITT et al., 2000) (Tabela 2). Os primers PGMY11 utilizados são

biotinilados na porção 5. As reações de amplificação utilizando os dois conjuntos de primers foram realizadas em um volume final de 25 µl, no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®) (Tabela 3 e Tabela 4). Amostras positivas teriam fragmentos em torno de 450pb.

Tabela 2 - Primers PGMY09/11 utilizados para a detecção de HPV por PCR e posterior tipagem de HPV por hibridação reversa em linha.

Primers		
Marcação	Designação	Sequências
Biotinilados	PGMY11-A	GCACAGGGACATAACAATGG
	PGMY11-B	GCGCAGGGCCACAATAATGG
	PGMY11-C	GCACAGGGACATAATAATGG
	PGMY11-D	GCCCAGGGCCACAACAATGG
	PGMY11-E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
Não biotinilados	PGMY09-F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-G	CGACCTAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-I	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
	PGMY09-J	GCCAAGGGGAAACTGATC
	PGMY09-K	CGTCCCAAAGGATACTGATC
	PGMY09-L	CGACCTAAAGGGAATTGATC
	PGMY09-M	CGACCTAGTGGAATTGATC
	PGMY09-N	CGACCAAGGGGATATTGATC
	PGMY09-P	GCCCAACGGAAGTATGATC
	PGMY09-Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC
	PGMY09-R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC
	HMB01	GCGACCCAATGCAAATTGGT

Tabela 3- Reagentes da PCR para a detecção de HPV

Reagentes para PCR	Concentração/volume (25 µl por reação)
DNTPs	0,2 mM
Tampão de reação	5 µL
MgCl2 50mM	1,5 mM
Primers	40 pmol 40 pmol
Taq polimerase	0,1 uds
DNA (amostra)	7 µL

Tabela 4- Parâmetros de ciclagem do HPV

Fase do programa	HPV	
	Temp	°C
Desnaturação inicial	5 min	94
35 ciclos	Desnaturação	1 min 94
	Anelamento	1 min 55
	Extensão	1 min 72
	Extensão final	10 min 72

3.3 Imunohistoquímica para a detecção das proteínas virais de HMPV

Secções de 3µm de tecidos foram desparafinizados em 3 banhos de xilol por 5 minutos cada, rehidratados por incubações de 3 minutos em concentrações decrescentes de álcool (JTBaker) (100%, 95%, 80%, 70%), seguido pelo desmascaramento antigênico com tampão EDTA (pH 8,0) (Sigma, St Louis, MO, USA) em uma panela a vapor a 95°C por 45 minutos, e então bloqueio da peroxidase endógena incubando secções de tecidos com 35% H₂O₂ (Synth) e metanol por 7 minutos, lavados com PBS-Tween pH 7,6 (Gibco, Grand Island, NY, USA), e posteriormente bloqueio com PBS-Tween com 1% de BSA (Gibco) e 5% de soro de cavalo (Gibco), e incubação com anticorpo primário anti a proteína N produzido em camundongo (ab94802 abcam), diluído 1:500, usando o diluente PBS/BSA e Tween (Sigma), overnight a 4°C.

No dia seguinte, secções de tecidos foram lavadas com PBS-Tween pH 7,6 (Gibco, Grand Island, NY, USA), e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (Mouse IgG BA-2000-vectastain ABC Kit-anti Mouse IgG biotinylated antibody) por 1 hora a temperatura ambiente, diluído 1:500 utilizando o mesmo diluente do anticorpo primário. A amplificação do sinal foi feita a partir da incubação com polímero conjugado com estreptavidina-peroxidase, na diluição 1:300, usando o diluente por PBS/BSA e Tween (Sigma), por 30 minutos, seguida pela visualização das marcações positivas com AEC (3-amino-9-etilcarbazol). As secções de tecidos foram então contracolorados com a hematoxilina Harris (Vector) e montadas com solução de glicerina para a aquisição das imagens. As aquisições das imagens foram feitas scaneando as secções de tecidos no ScanScope VS120 (Olympus Life Sciences, Tóquio, Japão), em campo claro, com ampliação de 400X. Como controle negativo utilizou-se uma amostra de tecido de colesteatoma primário negativo para o vírus.

3.4 Imunohistoquímica para a detecção das proteínas virais de HRV e HEV

Secções de 3µm de tecidos foram desparafinizados em 3 banhos de xilol por 5 minutos cada, reidratados por incubações de 3 minutos em concentrações decrescentes de álcool (JTBaker) (100%, 95%, 80%, 70%), seguido pelo desmascaramento antigênico com tampão EDTA (pH 8,0) (Sigma, St Louis, MO, USA) em uma panela a vapor a 95°C por 45 minutos, e então bloqueio da peroxidase endógena incubando secções de tecidos com 35% H₂O₂ (Synth) e metanol por 7 minutos, lavados com PBS-Tween pH 7,6 (Gibco, Grand Island, NY, USA), e posteriormente bloqueio com PBS-Tween com 1% de BSA (Gibco) e 5% de soro de cavalo (Gibco, Grand Island, NY, USA), e incubação com anticorpo primário anti a proteína estrutural de HRV (Dako M7064), diluído 1:1000, e uma mistura de dois anticorpos primários anti a proteína estrutural de HEV (MAB 8430 e MAB9410), diluídos 1:500, usando o diluente PBS/BSA e Tween (Sigma), overnight a 4°C.

No dia seguinte, secções de tecidos foram lavadas com PBS-Tween pH 7,6 (Gibco, Grand Island, NY, USA), e incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (Mouse IgG BA-2000-vectastain ABC Kit-anti Mouse IgG biotinylated antibody) por 1 hora a temperatura ambiente, diluído 1:500 utilizando o mesmo diluente do anticorpo primário. A amplificação do sinal foi feita a partir da incubação com polímero conjugado com estreptavidina-peroxidase, na diluição 1:300, usando o diluente PBS/BSA e Tween (Sigma), por 30 minutos, seguida pela visualização das marcações positivas com AEC (3-amino-9-etilcarbazol). As secções de tecidos foram então contracoloradas com a hematoxilina Harris (Vector) e montadas com solução de glicerina para a aquisição das imagens. As aquisições das imagens foram feitas scaneando as secções de tecidos no ScanScope VS120 (Olympus Life Sciences, Tóquio, Japão), em campo claro, com ampliação de 400X. Como controle negativo utilizou-se uma amostra de tecido de colesteatoma negativo para o vírus.

3.5 Imunohistoquímica sequencial (SIMPLE) para proteínas virais e para marcadores de fenótipos celulares

Cortes positivos por qPCR para HRV, HEV e HMPV foram investigados pela técnica de SIMPLE (Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing Method), que consiste em uma imunohistoquímica seriada. A técnica de SIMPLE foi utilizada para determinar os fenótipos celulares positivos para as proteínas estruturais dos vírus em questão. Depois das marcações dos antígenos virais, os mesmos cortes de tecidos, foram

testados sequencialmente com marcadores para linfócitos T Cd4 (Ab5690 e Ab133616), linfócitos TCd8 (Ab4055), linfócitos B (Ab103573), célula dendrítica (Ab154402), macrófago (Dako M7103), fibroblasto (Ab11333) e células epiteliais (Sc8018). Após marcação inicial positiva para proteínas virais, foi intercalada etapas de remoção do sinal entre cada um dos testes. Após realização da IHQ, a marcação foi revelada com cromógeno AEC (Vector Laboratories) por no máximo 30 min, e as imagens foram adquiridas no microscópio Scan Scope Olympus VS120 (Olympus Life Sciences, Tóquio, Japão). Em seguida, os tecidos marcados foram desidratados em série alcóolica até o desaparecimento do sinal positivo. Para eluição dos anticorpos, as lâminas foram incubadas em 0.15 mM KMnO₄/0.01 M H₂SO₄ por 2 min a temperatura ambiente, e lavadas imediatamente em água destilada. Os tecidos foram remarcados com outro anticorpo de interesse, e a conta coloração feita com hematoxilina de Harry (Vector) foi realizada somente após a última marcação.

3.6 Determinação de espécies de picornavirus por sequenciamento

Na tentativa de se determinar as espécies de picornavírus presente no tecido de colesteatoma foi realizado uma PCR convencional, tendo como alvo os genes das proteínas VP2 e VP4 de picornavírus. Tentou-se gerar os amplicons por meio de dois passos de amplificação sequencial. Na primeira rodada da PCR um mix de dois iniciadores (CCGGCCCCCTGAATGYGGCTAA), (ACATRTTYTSNCCAAANAYDCCCAT) foi utilizado na concentração de 12,5 µM, com a enzima Platinum PCR supermix HF (Invitrogen), em um volume final de 20 µl, com 3 µl de cDNA, seguindo os seguintes parâmetros de ciclagem: 94°C por 1', seguido por 35 ciclos de 94°C por 1', 42°C por 1', 72°C por 2'30''. Após a primeira rodada da PCR, uma segunda rodada foi realizada com 3 µl do produto da primeira rodada, e um mix de três iniciadores: (TTAGCCRCATTCAGGGGCCGG), (ACCRACACTTTGGGTGTCCGTG) e (TCWGGHARYTTCCAMCACCANCC) na concentração de 12,5 µM, com a enzima Platinum PCR supermix HF (Invitrogen), em um volume final de 20 µl, usando os mesmos parâmetros de ciclagem acima.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Detecção viral

Os testes de PCR para as 26 amostras de tecidos de colesteatoma primário testadas para um painel de vírus respiratórios e Papilomavírus revelaram a presença de genoma de vírus respiratórios em 9 (35%) dessas amostras. Com relação à frequência de detecção dos vírus respiratórios nesse tecido, o HRV foi detectado em 4 (15,3%), HEV em 4 (15,3), sendo que uma das amostras se encontrava coinfectada com HMPV, e o HboV em 1 (3,8%) (Tabela 2).

Tabela 5. Detecção viral em tecido de colesteatoma primário

Amostra	Vírus (%)				Total (%)
	HRV	HEV	HMPV	HBoV	
Colesteatoma primário	4 (15,3%)	4 (15,3%)	1*	1 (3,8%)	9 (35%)

*Amostra positiva para HMPV encontra-se coinfectada com HEV

4.2 Detecção de proteínas virais *in situ*

As amostras positivas por qPCR foram testadas quanto a expressão de proteínas *in situ* pela técnica de imunohistoquímica. Na IHQ foi possível visualizar marcação positiva para as proteínas estruturais de HRV, HEV e HMPV. Utilizando anticorpos específicos contra as proteínas estruturais foi possível observar a presença de HRV, HMPV e HEV em células epiteliais e células localizadas abaixo da região epitelial (Figura1). As células epiteliais foram imunomarcadas por meio de um anticorpo anti-citoqueratina (Sc8018).

Figura 1: Imunohistoquímica para a proteína estrutural de HEV, HMPV e HRV em tecido de colesteatoma primário. (A) tecido de colesteatoma negativo por qPCR para HEV utilizado como controle negativo mostrando ausência de marcação para a proteína viral. (B) tecido de colesteatoma negativo por qPCR para HMPV utilizado como controle negativo mostrando ausência de marcação para a proteína viral. (C) tecido de colesteatoma negativo por qPCR para HRV utilizado como controle negativo mostrando ausência de marcação para a proteína viral. (D), (G) e (J) marcação positiva para as proteínas estruturais de HRV, (E), (H) e (I) marcação positiva para as proteínas estruturais de HMPV, (F), (I) e (L) marcação positiva para as proteínas estruturais de HEV, (M), (N) e (O) marcação positiva para as proteínas estruturais de HRV.

HMPV e HEV, respectivamente. (E), (H) e (K) marcação positiva para citoqueratina (células epiteliais). (F), (I) e (L) Colocalização de citoqueratina com HRV, HMPV e HEV respectivamente (indicado pela cor amarela). Evidenciando a presença de proteína desses vírus em células epiteliais. (M), (N) e (O) marcação positiva na região localizada abaixo do epitélio para HRV, HMPV e HEV, respectivamente.

4.3 Determinação dos fenótipos de células positivas para HMPV, HEV e HRV

Os fenótipos celulares positivos para as proteínas estruturais dos vírus foram determinados por meio da técnica “*Sequential Immunoperoxidase Labeling and Erasing*” (SIMPLE).

4.3.1 Imunofenotipagem de células positivas para HRV no tecido de colesteatoma.

Pela técnica de SIMPLE foi possível visualizar marcação positiva para HRV em fibroblastos, linfócitos T CD8+, linfócito B, macrófagos e linfócito TCD4+. (Figura 2). No presente estudo determinamos os linfócitos TCD4+ com a presença de proteína viral de HRV por meio da utilização de dois marcadores celulares: CD3+ e CD4+, pois apenas um marcador não é o suficiente para confirmar o fenótipo celular.

Figura 2. Marcação sequencial para proteína estrutural de HRV e fenótipos celulares. (A) marcação positiva para HRV pseudo-colorido em verde. (B) marcação positiva para fibroblasto pseudo-colorido em vermelho. (C) colocalização de HRV e marcador de fibroblasto (indicado pela cor amarela). (D) marcação positiva para HRV pseudo-colorido em verde. (E) marcação positiva para linfócito TCD8+ pseudo-colorido em vermelho. (F) colocalização de HRV e marcador de linfócito T CD8+ (indicado pela cor amarela). (G) marcação positiva para HRV pseudo-colorido em verde. (H) marcação positiva para linfócito B pseudo-colorido em vermelho. (I) colocalização de HRV e marcador de linfócito B (indicado pela cor amarela). (J) marcação positiva para HRV pseudo-colorido em verde. (K) marcação positiva para macrófago pseudo-colorido em vermelho. (L) colocalização de HRV e marcador de macrófago (indicado pela cor amarela).

(M) marcação positiva para HRV pseudo-colorido em verde. (N) marcação positiva para CD4+ pseudo-colorido em vermelho. (O) colocalização de HRV e marcador CD4+ (indicado pela cor amarela). (P) marcação positiva para CD3+ pseudo-colorido de magenta.

4.3.2 Imunofenotipagem de células positivas para HEV no tecido de colesteatoma

Marcação positiva para a proteína estrutural de HEV foi observado em macrófagos, fibroblastos e células dendríticas (Figura 3).

Figura 3. Marcação sequencial para proteína estrutural de HEV e fenótipos celulares. (A) marcação positiva para HEV pseudo-colorido em verde. (B) marcação positiva para macrófago pseudo-colorido em vermelho. (C) colocalização de HEV e marcador de macrófago (indicado pela cor amarela). (D) marcação positiva para HEV pseudo-colorido em verde. (E) marcação positiva para fibroblasto pseudo-colorido em vermelho. (F) colocalização de HEV e marcador de fibroblasto (indicado pela cor amarela). (G) marcação positiva para HEV pseudo-colorido em verde. (H) marcação positiva para células dendríticas pseudo-colorido em vermelho. (I) colocalização de HEV e marcador de fibroblasto (indicado pela cor amarela).

4.3.3 Imunofenotipagem de células positivas para HMPV no tecido de colesteatoma.

Proteína de HMPV foi evidenciada em fibroblasto, linfócito TCD8+, células dendríticas e macrófagos (Figura 4).

Figura 4. Marcação sequencial para proteína estrutural de HMPV e fenótipos celulares. (A) marcação positiva para HMPV pseudo-colorido em verde. (B) marcação positiva para fibroblasto pseudo-colorido em vermelho. (C) colocalização de HMPV e marcador de fibroblasto (indicado pela cor amarela). (D) marcação positiva para HMPV pseudo-colorido em verde. (E) marcação positiva para linfócito TCD8+ pseudo-colorido em vermelho. (F) colocalização de HMPV e marcador de linfócito T CD8+ (indicado pela cor amarela). (G) marcação positiva para HMPV pseudo-colorido em verde. (H) marcação positiva para células dendríticas pseudo-colorido em vermelho. (I) colocalização de HMPV e marcador de células dendríticas (indicado pela cor amarela). (J) marcação positiva para HMPV pseudo-colorido em verde. (K) marcação positiva para macrófago pseudo-colorido em vermelho. (L) colocalização de HMPV e marcador de macrófago (indicado pela cor amarela).

4.4 Determinação de espécie de picornavírus presentes em tecido de colesteatoma primário

Por existir estudos que demonstram que os picornavírus apresentam diferentes fenótipos de patogenicidade nos tecidos nos quais infectam, procuramos então, determinar por sequenciamento as espécies presentes nas amostras positivas por qPCR para HRV e HEV. Em nenhuma das amostras positivas por qPCR para HRV e HEV, obtivemos sucesso na amplificação da sequência desejada. Atribuímos o nosso insucesso às amostras utilizadas no estudo, que por se tratar de material parafinado, o genoma viral estivesse comprometido ao ponto de nos impedir a amplificação da sequência desejada.

Figura 5. Eletroforese horizontal em gel de agarose 2% da segunda PCR (Nested) para a obtenção do produto para o sequenciamento. (A) marcador molecular 1500pb. (B-E) amostras positivas por qPCR para HRV. (F-I) amostras positivas por qPCR para HEV. (I) controle negativo da PCR. (L) Controle positivo da PCR – isolado de HRV-16.

DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

Embora a etiopatogênese do colesteatoma primário não seja totalmente compreendida, há evidências de que as otites médias possam desempenhar um papel importante nessa doença, ao comprometer o funcionamento normal da tuba auditiva ou atuando como um reservatório para infecção por patógenos. No estudo prospectivo de Schmidt Rosito e colaboradores (2017) foi observado essa possível associação, onde de 1710 pacientes com OMC incluídos no estudo, 419 (24,5%) desenvolveram colesteatoma adquirido.

Já foi demonstrado que tecidos da via aérea superior, especialmente adenoides e amígdalas podem ser alvo de infecção persistente por vírus respiratórios (PROENCA-MODENA et al., 2012). Tonsilas palatinas (amígdalas) e particularmente tonsila faríngea (adenóide), apresenta uma íntima relação anatômica com a tuba auditiva, e consequentemente, a orelha média. Os vírus respiratórios presente nesses tecidos podem ascender para a orelha média, e assim, contribuir para o desenvolvimento ou a persistência das otites médias.

Buzzato e colaboradores (2017) estudando o perfil de patógenos em secreções de otite média com efusão de crianças encontrou positividade para HEV, HRV e HMPV e HBoV em 19 de 37 (51,3%) das amostras testadas por qPCR.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve a presença de vírus respiratórios em amostras de tecido de colesteatoma primário, obtidas de pacientes com ausência de sinais e sintomas de doença respiratória aguda no momento ou pelo menos quatro semanas antes da cirurgia de remoção do tumor como uma forma de tratamento. No estudo pela técnica de qPCR foi possível detectar genoma de HEV, HRV, HMPV e HboV em 9 de 26 (35%) das amostras testadas, curiosamente, os mesmos vírus detectados nas secreções de otite média com efusão de crianças descrito no trabalho de Buzzato e colaboradores (2017). Apesar da frequência de detecção de vírus respiratórios no nosso estudo ter sido um pouco inferior, é importante salientar que ao contrário do estudo destes autores, as amostras utilizadas no nosso estudo avaliaram material fixado e parafinado, um fator que pode interferir na detecção viral, devido ao comprometimento da integridade do genoma viral.

Além disso, também foi possível detectar proteína *in situ* de HRV, HEV, HMPV, indicando a presença do vírus no tecido hiperplásico do colesteatoma. A presença de proteína viral pode ser um indício que o tecido esteja funcionando como sítio de infecção com atividade produtiva de vírus, e que o genoma viral detectado por qPCR não seria

apenas um resultado de uma infecção remanescente. Atualmente existem estudos de detecção de HPV em colesteatoma, no entanto, a frequência é baixa (CHAO et al., 2000; FRANZ et al., 2007). A justificativa dos autores em procurar genoma de HPV nesse tecido se deve a capacidade que esse vírus tem de induzir hiperplasia celular no tecido na qual ele infecta. O mecanismo pela qual ocorre essa indução ainda é desconhecido. Apesar de existirem alguns estudos, nunca foi possível fazer uma correlação direta devido à baixa frequência de detecção. Neste trabalho, também procurou-se verificar a presença de HPV no tecido de colesteatoma primário, entretanto, em nenhuma das amostras foi detectado o genoma do vírus.

Ainda, no estudo, foi possível determinar de forma detalhada e inédita os tipos celulares que estavam albergando HRV, HEV e HMPV no tecido. A presença de marcação para as proteínas estruturais virais mostraram uma ampla distribuição destes vírus no tecido colesteatomatoso. Além disso, os resultados indicaram a presença de marcação positiva para esses vírus não apenas em células epiteliais, mas também em outros tipos celulares.

Infecção de células epiteliais por HRV, HEV e HMPV já é estabelecido na literatura, sabe-se que esses vírus apresentam um tropismo por esse tipo de célula, especialmente às do epitélio respiratório (ARRUDA et al., 1995). Dessa forma, a presença de marcação positiva para esses vírus no epitélio de tecido de colesteatoma não é um evento inesperado. No entanto, é válido levantar questionamento acerca desse achado. O colesteatoma apresenta uma característica hiperproliferativa, podendo em alguns casos invadir estruturas adjacentes a orelha média e reincidir após a remoção do tumor cirurgicamente. Estudos de infecção de HPV na mucosa oral apontam uma correlação do vírus com a patogênese das lesões verrugosas benignas, inclusive com a hiperplasia epitelial (FERRARO et al., 2011). O presente estudo por se tratar de uma descrição pioneira de detecção de vírus respiratórios no tecido de colesteatoma, ainda não é possível estabelecer uma correlação com a etiopatogênese do tumor, mas os nossos achados podem ajudar a esclarecer alguns questionamentos que são levantados a cerca dele.

Além das células epiteliais, em linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, linfócitos B, macrófago e fibroblasto foram observados a presença de proteína viral de HRV. Também foi observado a presença de proteína viral de HEV em células dendríticas, macrófago e fibroblasto. Marcação positiva para proteína de HMPV foi visualizada em linfócito T CD8+, macrófago, células dendríticas e fibroblasto. Em um microambiente tumoral, existem células neoplásicas e células não-neoplásicas, como por exemplo, células do

sistema imune: linfócitos B, linfócitos T, macrófagos, células dendríticas. Essas células nesse microambiente, na teoria, teriam como função reconhecer e eliminar células neoplásicas, antes mesmo da formação de uma massa. O nosso achado de detecção de vírus respiratórios nesses tipos celulares se torna importante, porque nos faz questionar até que ponto a presença do vírus poderia impactar na modulação da resposta imune desses tipos celulares, e consequentemente, na patogênese da doença.

Estudos já evidenciaram que HRV pode ativar linfócitos T CD4 + e linfócitos T CD8+, mesmo na ausência de células apresentadoras de antígenos (APCs), e com isso, a produção de citocinas inflamatórias entre outros fatores (ILARRAZA et al., 2013)

O perfil de citocinas tem sido muito estudado no intuito de esclarecer o comportamento agressivo do colesteatoma. As citocinas são produzidas pelas células em resposta a estímulos inflamatórios e são capazes de alterar o comportamento de células que as produzem ou de células vizinhas.

Estudos apontam que no tecido de colesteatoma, os fibroblastos sob estímulos podem produzir prostaglandinas e collagenases, das quais são fatores mediadores no processo de reabsorção óssea. Já foi observado também, que os macrófagos e linfócitos secretam TNF- α que pode agir como mediador nos processos de destruição óssea e remodelação tecidual, além de funcionar como potente estimulador da diferenciação e proliferação celular. Podendo também atuar na diferenciação dos queratinócitos levando a um aumento na produção de queratina (NETO et al., 2011).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o estudo demonstra pela primeira vez a presença de genoma de HBoV, HMPV, HEV e HRV, e muito além do que isso, a presença de proteína viral *in situ*, um grande indício de que esses vírus possam estar utilizando esse tecido como um sítio de replicação. Observamos que a presença de proteína viral vai além de células epiteliais, estando presentes também em células envolvidas na resposta imune. Estes achados ainda não permitem maiores inferências sobre as consequências da presença desses vírus nesses fenótipos celulares e na patogênese da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLANDER T et al. **Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples.** Proc. Natl. Acad. Sci. 2005.
2. ANDREWES CH et al. **Para-influenza viruses 1, 2, and 3: suggested names for recently described myxoviruses.** Virology. v .1, p. 129-30. 1959.
3. ARNOTT, A. et al. **A Study of the Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV) in Cambodia Reveals the Existence of a New HRSV Group B Genotype.** Journal of Clinical Microbiology. v.10, p.3504-3513. 2011.
4. ARRUDA E et al. **Localization of human rhinovirus replication in the upper respiratory tract by in situ hybridization.** J Infect Dis, v. 5 p. 1329-1333. 1995.
5. BERNARD, H.U. et al. **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** Virology, v. 401, n. 1, p. 70-9, 2010.
6. BLUESTONE, Charles D. **Studies in Otitis Media: Children's Hospital Of Pittsburgh-University of Pittsburgh Progress Report-2004.** The Laryngoscope, v. 114, p. 1–26, 2004.
7. BROWNING, Geroge G. **A etiopathology of inflammatory conditions of the external and middle ear.** In: Booth JB (ed.) Scott- Brown's Otolaryngology, 6th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford, v.3, p. 1–37, 1997.
8. BUZATTO, G. P. et al. **The pathogens profile in children with otitis media with effusion and adenoid hypertrophy.** PLoS ONE, v. 12, p. 1–12, 2017.
9. CDC. **Protocol of real time RT-PCR for influenza A** [www.who.int/crs/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html]
10. CHANOCK R M et al. **Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease.** N Engl J Med. v .5, p.207-213. 1958.
11. CHAO, Wen-Yuan et al. **Detection of human papillomavirus in cholesteatomas.** Eur Arch Otorhinolaryngol, v. 257, p. 120–123, 2000.
12. CHOLE, Richard A. **Chronic Otitis Media, Mastoiditis, and Petrositis.** In: Cummings CW et al. (eds.) Otolaryngology-Head & Neck Surgery. 3rd ed. Mosby, St. Louis, p. 3026–46, 2015
13. COLLINS, P I e CROWE, Jel. **Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus, cap. 46. In: knipe, AM; howley, PM [Eds]. Fields Virology.** Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins – Wolters Kluwer Business, p. 1601-1636.

14. COSTA, Selaimen S. et al.. **A patogênese dos colesteatomas**. Rev Bras Otor, v 4, p. 30-5, 1992.
15. DEFFERNEZ, Christelle et al. **Amplicon Sequencing and Improved Detection of Human Rhinovirus in Respiratory Samples**. Society, v. 42, p. 3212–3218, 2004.
16. DEVANEY, Kenneth O. et al. **Clinicopathological consultation ear cholesteatoma versus cholesterol granuloma**. Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology, v. 106, p. 79–85, 1997.
17. DE VILLIERS E M. et al. **Classification of papillomaviruses**. Virology. v. 324, p.17-27. 2004.
18. ELDEN, Van L J R. et al. **Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR**. Journal of clinical microbiology, v. 1, p. 196-200, 2001.
19. ENDERS J F et al. **Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses**. Science. v.3212, p.119-20. 1956.
20. FERKIDIS, Eleftherios et al. **Correlation of clinical and surgical findings to histological features (koilocytosis, papillary hyperplasia) suggesting papillomavirus involvement in the pathogenesis of cholesteatoma**. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, v. 12, p. 368-71, 2006.
21. FERRARO L T C et al., **Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associada**. Bras Patol Med Lab. v. 47, p. 451-459. 2011.
22. FRANZ, P. **Prevalence of Human Papillomavirus DNA in Cholesteatomas**. ORL, v. 69, p. 251-255, 2007.
23. GARBINO, Jorge et al. **Lower respiratory viral illnesses: Improved diagnosis by molecular methods and clinical impact**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 170, p. 1197–1203, 2004.
24. GRAVITT, P. E. et al. **Improved amplification of genital human papillomaviruses**. Journal of Clinical Microbiology, California, v. 38, p.357-61, 2000.
25. GURDA B L et al. **Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae**. J Virol. v. 12, p.5880-5889. 2010.
26. HARRISON MS et al. **Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections**. Int J Biochem Cell Biol. v.9, p.1416-1429. 2010.

27. HEIM, Albert et al. **Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR.** Journal of Medical Virology, v. 70, p. 228–239, 2003.
28. HOWLEY P M et al. **Papillomaviruses.** IN: knipe d m, howley p m, griffin d e, lamb r a, martin m a, roizman b, straus s e (ed). **Fields Virology**, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
29. HU, Aizhong et al. **Quantitation of Respiratory Syncytial Virus A and B by Real-Time PCR Simultaneous Detection , Subgrouping , and.** Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 18–24, 2003.
30. ILARRAZA et al. **Rhinovirus has the unique ability to directly activate human T cells in vitro.** Journal of Allergy and Clinical Immunology. v.2, p.395-404.2013.
31. KAJAN et al. **A multigene typing system for human adenoviruses reveals a new genotype in a collection of Swedish clinical isolates.** Plos One. v.12, p. 1-15. 2018.
32. KESSON A M. **Respiratory virus infections.** Paediatr Respir Rev. v.3 p 240-248. 2007
33. KUYPERS, Jane et al. **Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR.** Journal of Clinical Virology, v. 33, p. 299–305, 2005.
34. KUYPERS, J. et al. **Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children.** Journal of Clinical Microbiology, v. 44, p. 2382–2388, 2006.
35. KUYPERS, June et al. **Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes.** Pediatrics, v.1, p. 70-76, 2007.
36. LAI M M e CAVANAGH D. **The molecular biology of coronaviruses.** Adv Virus Res. v.48. p.1-100. 1997.
37. LEMMERLING, Marc M e Foer, De Bert. **Imaging of cholesteatomatous and non-cholesteatomatous middle ear disease.** In: Lemmerling M, Kollias S, editors. Radiology of the petrous bone. Berlin: Springer, p. 31–47, 2004.
38. LEPERQUE, Sabine e LEIGH, Irene. **Immunohistochemical Analysis of the Cytokeratin Expression in Middle Ear Cholesteatoma and Related Epithelial Tissues.** Annals of Otology, Rhinology & Laryngology, p. 931–938, 2015.
39. MANFREDI, Ana Paula S e SILVA, Ariovaldo A Da. **Resumo / Summary,** v. 67, p. 763–768, 2001.
40. MCLEAN, G R et al. **Rhinovirus infections and immunisation induce cross-serotype reactive antibodies to VP1.** Antivir. Res. v. 95, p.193–201. 2012.

41. MILEWSKI C. et al. **Basic fibroblast growth factor (b-FGF) in the perimatrix of cholesteatoma.** HNO, v.9, p. 804-8, 1998.
42. MORGAN C e HOWE C. **Structure and development of viruses as observed in the electron microscope.** IX. Entry of parainfluenza I (Sendai) virus. J Virol. v.10, p.1122-1132. 1968.
43. MUÑOZ N. et al. **HPV in the etiology of human cancer.** Vaccine, v. 24, p.1-10, 2006.
44. NESKE, Florian et al. **Real-time PCR for diagnosis of human bocavirus infections and phylogenetic analysis.** Journal of Clinical Microbiology, v. 45, p. 2116–2122, 2007.
45. NETO C S. **Tratado de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cervicofacial.** 2th ed. São Paulo: Roca, 2011.
46. NEVOUX, J. et al. **Childhood cholesteatoma.** European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases, v. 127, p. 143–150, 2010.
47. NYSTRÖM, Kristina et al. **Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells.** Journal of Virological Methods, v. 118, p. 83–94, 2004.
48. PALESE P e Shaw M L. **Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, cap. 47. In: KNIPE, AM; HOWLEY, PM [Eds]. Fields Virology.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins – Wolters Kluwer Business. p. 1647-1678. 2007.
49. PEIRIS J S et al. **Severe acute respiratory syndrome.** Nat Med. v.12, p. 88-97. 2004.
50. PELON, W et al. **A cytopathogenic agent isolated from naval recruits with mild respiratory illness.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 94, p. 262-267, 1957.
51. PEREIRA, Celina S. B. e ALMEIDA, Clemente I. R. e VIANNA, Maria Regina. **Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear Ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média.** Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 68, p. 453–460, 2002.
52. PIKOR, Larissa A. et al. **DNA Extraction from Paraffin Embedded Material for Genetic and Epigenetic Analyses,”** J. Vis. Exp, v. 49, p. 2763, 2011.
53. PRICE, W H. **The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans.** Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. v. 42, p. 892-896, 1956.
54. PROENCA-MODENA, Jose Luiz. et al. **High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease.** PLoS ONE, v. 7, p. 8, 2012.

55. ROMERO, J R e Newland, J G. **Viral meningitis and encephalitis: Traditional and emerging viral agents.** Semin. Pediatr. Infect. Dis. v. 14, p. 72–82. 2003.
56. ROSITO, Leticia Petersen Schmidt et al. **Characteristics of 419 patients with acquired middle ear cholesteatoma.** Revista Brasileira de otorrinolaringologia, v. 83, p. 126–131, 2017.
57. RUSSELL W C. **Update on adenovirus and its vectors.** J Gen Virol. v. 81, p.2573-2604. 2000.
58. ROWE W P et al. **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.** Proc Soc Exp Biol Med. v.3, p.570-573. 1953.
59. SANTOS, Rodrigo. I et al. **Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with oropouche virus.** Virus Research, v. 170, p. 25–33, 2012.
60. SEMAAN, Maroun T. e MEGERIAN, Cliff A. **The Pathophysiology of Cholesteatoma.** Otolaryngologic Clinics of North America, v. 39, p. 1143–1159, 2006.
61. SPAAN W et al. **Coronaviruses: structure and genome expression.** J Gen Virol.v.12. p. 2939-52. 1988.
62. STOREY D G et al. **Structural characterization of virion proteins and genomic RNA of human parainfluenza virus 3.** J. Virol. v.3, p.761-766. 1984.
63. SWARTZ, Joel D. **Colesteatomas of the middle ear. Diagnosis Etiology and Complications.** Radiol Clin North Am, v.1, p. 15-34, 1984.
64. TAPPAREL, C et al. **Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases.** Infect. Genet.Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. v. 14, p.282–293. 2013.
65. TYRREL D A e BYNOE M L. **Cultivation of a novel type of common-cold vírus in organ cultures.** Br Med J. v.5448. p.1467-1470. 1965.
66. VELLINGA J et al. **The adenovirus capsid: major progress in minor proteins.** J Gen Virol. v. 6, p.1581-1588. 2005.
67. WENDT, H: **Dequamative Entzung des Mittelhors (“Cholesteatom des Felsenbeins” der Autoren).** Arch Heilk, v. 14, p.428, 1973.
68. WILSON, V G et al. **Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features.** Virus Genes, v. 24, p. 275–90. 2002.
69. WINTHER, Birgit et al. **Viral respiratory infection in schoolchildren: effects on middle ear pressure.** Pediatrics, v. 109, p. 826–32, 2002.
70. WITTMAACK, Karl. **Wie entsteht ein genuines Cholesteatom?** Archiv f??r Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde, v. 137, p. 306–332, 1933.

71. XU R H et al. **Epidemiologic clues to SARS origin in China.** Emerg Infect Dis. v. 6, p.1030-1037. 2004.
72. WOLD W S M e HORWITZ M S. **Adenoviruses, cap. 64. In: KNIPE, AM; HOWLEY, PM [Eds]. Fields Virology.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins – Wolters Kluwer Business. P. 2395-2426. 2007.
73. ZHENG Z et al. **Papillomavirus genome structure, expression, and posttranscriptional regulation.** Frontiers in Bioscience. v. 11, p. 2286-2302. 2006.
74. ZHI N et al. **Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity.** J. Virol. v.80, p.5941-5950. 2006.
75. ZHONG N S et al. **Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003.** Lancet. v.9393, p.1353-1358. 2003.