

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos

Infecção assintomática de tonsilas por coronavírus humanos endêmicos

Matheus Dias

Ribeirão Preto, 2023

MATHEUS DIAS

Infecção assintomática de tonsilas por coronavírus humanos endêmicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Departamento de Biologia Celular e
Molecular e Bioagentes Patogênicos,
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Virologia
Grau pretendido: Mestre
Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da
USP (BDTD)

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

DIAS, MATHEUS.

Infecção assintomática de tonsilas por coronavirus humanos endêmicos.

Ribeirão Preto, 2023.

41 pg.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Arruda, Eurico de.

1. Coronavirus; 2. Tecidos linfoides; 3. Infecção assintomática; 4. Anticorpos; 5. Persistência viral.

Folha de aprovação da banca examinadora

DIAS, M. Infecção assintomática de tonsilas por coronavirus humanos endêmicos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições e entidades:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – (CAPES),
código de fomento 001.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP, Universidade de São Paulo.

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FAEPA- HC-
FMRP- USP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à toda minha família, especialmente aos meus pais e meu irmão, por todo o suporte desde sempre. Agradeço imensamente pelo incentivo e confiança depositada todo esse tempo.

Agradeço muito ao Professor Dr. Eurico de Arruda Neto por toda a orientação, que vem desde a IC, até os dias de hoje, com o final deste projeto.

Quero expressar minha gratidão à todos os meus amigos de trabalho, que diariamente faziam com que o laboratório fosse um lugar melhor, compartilhando sempre nossas angustias, felicidades, sonhos, e risadas.

Sem meus amigos da biologia desenvolver esse trabalho também não seria possível. Ficarmos juntos e mantermos a amizade durante esse período de fim da graduação e vida de pós graduação, com certeza é algo memorável, por isso também me orgulho muito de te-los perto de mim.

A todos aqui lembrados fica sempre o meu muito obrigado, e saibam que esse trabalho também é de vocês!!!

RESUMO

DIAS, M. **Infecção assintomática de tonsilas por coronavirus humanos endêmicos.** 2023. 41 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Os coronavírus humanos (HCoV) são conhecidos por desencadear infecções respiratórias agudas (IRA). Em geral, os coronavírus dos tipos endêmicos, HCoV-229E, -OC43, -NL63 e -HKU1, causam doenças respiratórias em geral leves, mas que podem evoluir para complicações respiratórias graves. Estudos já mostraram a presença de SARS-CoV-2 em tecidos linfoides saudáveis, entretanto pouco se sabe o processo infeccioso dos vírus endêmicos em amígdalas palatinas e adenoides de pacientes assintomáticos. Como já mostramos anteriormente, RNA de HCoVs endêmicos pode ser detectado por RT-PCR, em tonsilas e secreções nasofaríngeas em crianças assintomáticas, o que torna importante entender estas infecções e maiores detalhes. Assim, investigamos a presença de coronavírus humanos endêmicos em tecidos de amígdalas e adenoides durante o período de pandemia de SARS-CoV-2. Por imuno-histoquímica foi possível verificar a distribuição *in situ* de HCoVs nos tecidos linfoides, evidenciando positividade em regiões folicular, extra-folicular e epitelial. A infecção foi detectada predominantemente em linfócitos B. Os soros dos pacientes positivos para coronavírus endêmicos não mostrou presença de anticorpos neutralizantes de reação cruzada contra SARS-CoV-2. Não foi possível isolar coronavírus endêmicos diretamente dos tecidos infectados em culturas de células, sugerindo ausência de secreção de vírios infecciosos.

Palavras-Chave: Coronavirus; Tecidos linfoides; Infecção assintomática; Anticorpos; Persistência viral.

ABSTRACT

DIAS, M. **Asymptomatic infection of tonsils by endemic human coronaviruses.** 2023. 41 p. Dissertation (Msc. in Molecular and Cell Biology) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Human coronaviruses (HCoVs) are known to trigger acute respiratory infections (ARI). In general, coronaviruses of the endemic types, HCoV-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1, cause respiratory diseases that are generally mild but can progress to serious respiratory complications. Studies have already shown the presence of SARS-CoV-2 in normal lymphoid tissues, however little is known about the infectious process of endemic viruses in palatine tonsils and adenoids of asymptomatic patients. As we have previously shown, RNA from endemic HCoVs can be detected by RT-PCR in tonsils and nasopharyngeal secretions in asymptomatic children, which makes it important to understand these infections in greater detail. Therefore, we investigated the presence of endemic human coronaviruses in tonsil and adenoid tissues during the SARS-CoV-2 pandemic period. Using immunohistochemistry, it was possible to verify the in situ distribution of HCoVs in lymphoid tissues, showing positivity in follicular, extrafollicular, and epithelial regions. The infection was detected predominantly in B lymphocytes. Sera from patients positive for endemic coronaviruses did not show the presence of cross-reactive neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. It was not possible to isolate endemic coronaviruses directly from infected tissues in cell cultures, suggesting the absence of secretion of infectious viruses.

Keywords: Coronavirus; Lymphoid tissues; Asymptomatic infection; Antibodies; Viral persistence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição global dos coronavírus endêmicos.....	13
Figura 2: Hospedeiros de diferentes coronavírus.....	15
Figura 3: Representação esquemática da estrutura de coronavirus.....	16
Figura 4: Representação esquemática do genoma de coronavirus.....	17
Figura 5: Representação esquemática do genoma de HCoV's sazonais.....	18
Figura. 6: Representação histológica das principais regiões das tonsilas.....	20
Figura 7: Imunohistoquímica para a proteína N de HCoV's endêmicos em cortes de tonsilas humanas.....	30
Figura 8: Imunofenotipagem das células infectadas por coronavírus sazonais.....	31
Figura 9: Efeito citopático após 3 passagens cegas.....	32
Figura 10: Imunofluorescência para confirmar o isolamento e propagação de HCoV.....	33
Figura 11: Ensaio de neutralização para HCoV's sazonais.....	34
Figura 12: Ensaio de neutralização para SARS-CoV-2.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomas clínicos de cada um dos quatro coronavírus sazonais.....	15
Tabela 2: Primers e sondas utilizados para detecção do genoma dos Coronavírus endêmicos e gene endógeno.....	23
Tabela 3: Composição das RT-PCR s.....	24
Tabela 4: Anticorpos usados para a marcação histoquímica.....	25
Tabela 5: HCoV sazonais detectados em tonsilas hipertróficas humanas.....	28
Tabela 6: Frequências de HCoVs encontradas nos pacientes.....	29

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	12
1.1 - Os Coronavírus.....	13
1.2 - Estrutura Viral.....	16
1.3 - Ciclo Replicativo.....	18
1.4 – Tonsilas.....	20
2 – JUSTIFICATIVA.....	21
3 – OBJETIVO.....	21
3.1 - Objetivos Específicos.....	21
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 - Coleta e processamento de amostras de tonsilas humanas.....	22
4.2 - Detecção de coronavírus RT-PCR.....	23
4.3 – Imunohistoquímica Seriada.....	24
4.4 - Propagação de estoques de HCoV.....	26
4.5 – Imunofluorescência.....	26
4.6 – Ensaio de Neutralização.....	27
5 – RESULTADOS.....	28
5.1 - Detecção de genomas de coronavírus endêmicos por RT-PCR em amígdalas e adenoides.	28
5.2 – Detecção de proteína estrutural de HCoVs endêmicos por IHQ em amígdalas e adenoides.	30
5.3 - Linfócitos B são locais de infecção de HCoV endêmicos.....	31
5.4 – Tentativa de Isolamento Viral.....	32
5.5 - A isolamento e propagação de estoque viral.....	32
5.6 - Ensaio de neutralização dos sosors de pacientes com HCoVs endêmicos...34	
6 – DISCUSSÃO.....	35

7- CONCLUSÃO.....	37
-------------------	----

8 – REFERÊNCIAS.....	37
----------------------	----

1. INTRODUÇÃO

As infecções respiratórias agudas (IRA) estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. IRAs podem ser classificadas em superior e inferior, dependendo da localização anatômica (Tai C-C et al, 2020), e as suas repercussões clínicas podem ser muito diferentes, variando desde assintomáticas até pneumonias graves e letais, passando por um amplo espectro de gravidade de sintomas (Galanti et al., 2019). As IRAs assintomáticas ou pouco sintomáticas são frequentes, o que tem implicações significativas para a saúde pública, uma vez que indivíduos oligossintomáticos podem ser potenciais fontes de infecção, contribuindo para a disseminação de surtos (Galanti et al., 2019).

São conhecidos mais de 200 tipos de vírus respiratórios, incluindo coronavírus humano (HCoV), adenovírus, enterovírus, , metapneumovírus humano, rinovírus, influenza, parainfluenza, bocavirus e vírus sincicial respiratório (Troy NM et al; Costa et al. 2022). Os HCoVs têm recebido atenção especial nas últimas décadas, devido a surtos de doenças graves causadas por eles. Merecem ênfase os surtos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês Severe Acute Respiratory Syndrome) causada pelo SARS-CoV em 2002-2003, o surto de Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês Middle East Respiratory Syndrome) causada pelo MERS-CoV em 2012, e a recente pandemia de SARS-CoV-2, causando COVID-19, do inglês coronavirus infectious disease-19. São conhecidas atualmente sete espécies capazes de infectar humanos: SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, e os quatro coronavirus endêmicos HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E e HCoV-NL63, que causam IRAs comuns, responsáveis por 15% a 30% dos casos de “resfriado” (Casella et al. 2023; Liu et al. 2021).

Os órgãos linfoides secundários são locais essenciais para a montagem da resposta imune contra patógenos, inclusive os vírus respiratórios. No trato respiratório superior localizam-se as estruturas linfoides amígdalas palatinas, adenoide, amígdalas linguais e tubais, onde se iniciam respostas contra os patógenos respiratórios (van Kempen, 2000). Estudos anteriores do nosso grupo e de outros grupos mostraram a presença de genomas de coronavírus endêmicos, bem como de outros vírus respiratórios, em tecidos de amígdalas palatinas e adenóides humanas removidas de crianças sem sintomas de IRA

(Proenca-Modena et al., 2012; Lima et al., 2023). Pouco se sabe sobre as infecções por HCoVs endêmicos em órgãos linfóides secundários, o que motivou o presente projeto.

1.1 - Os Coronavírus

Os coronavírus humanos (HCoVs) pertencem à ordem Nidovirales da família Coronaviridae, e estão distribuídas nos gêneros Alpha-CoV, que inclui as espécies HCoV-229E e NL63; e Beta-CoV, compreendendo as espécies HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 (MALIK et al., 2020). Os coronavirus sazonais causam 15% a 30% dos resfriados comuns, e há evidências sorológicas de que até 90% dos adultos têm anticorpos para esses vírus (SARIOL et al., 2020). No período de 2002 a 2003 surgiu SARS-CoV causador de SARS; em 2012o MERS-CoV, e em 2019 o SARS-CoV-2, ambos originados por spillovers a partir de espécies animais (MOHAMADIAN et al., 2021). Além disso, os coronavírus HCoV-229E, -NL63, -OC43, -HKU1 são de ocorrência mundial, cocirculam em todos os continentes, causam infecções respiratórias predominantemente no trato respiratório superior de crianças, e são transmitidos por meio gotículas(MASTERS and Perlman, 2013; Su et al. 2016; Liu et al. (2021)) (Figura 1).

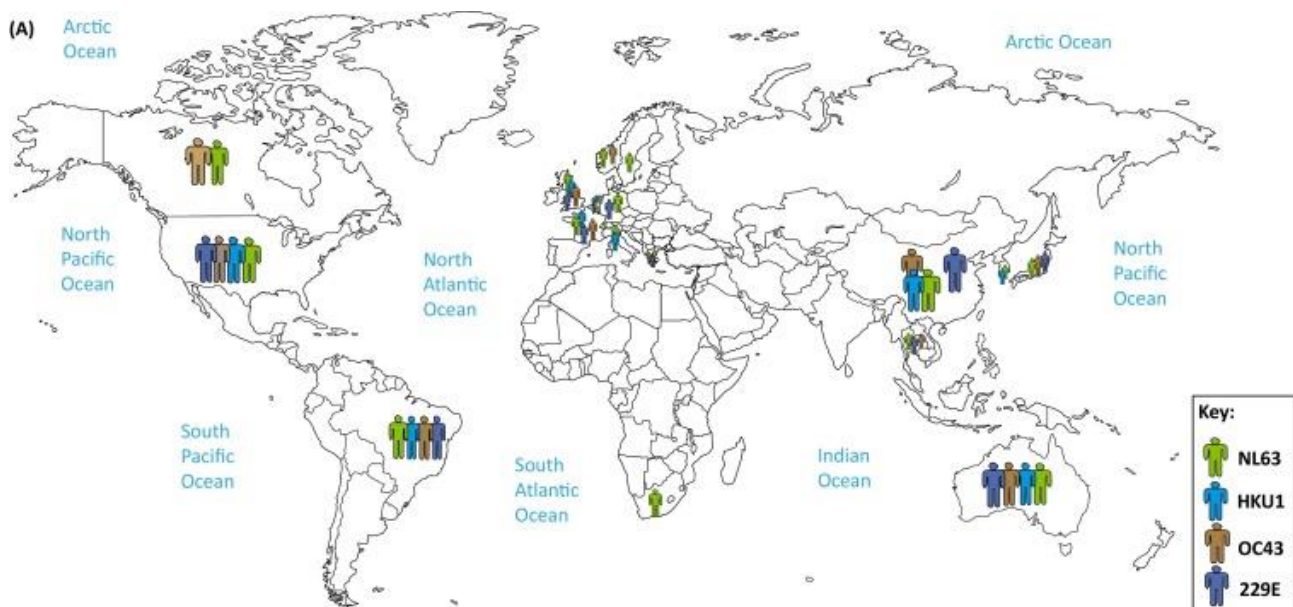


Figura 1: Distribuição global dos coronavírus endêmicos. A distribuição global dos coronavírus humanos NL63, HKU1, OC43 e 229E é representada por verde, azul, marrom e roxo, respectivamente. (Adaptado de Su et al. 2016).

O primeiro coronavírus humano, HCoV-229E, foi isolado no laboratório de David

Tyrrell, na Inglaterra (Tyrrell et al., 1965). Em seguida, descrito por pesquisadores norte americanos em 1966 (Hamre et al., 1966), durante a caracterização de cinco novos agentes do trato respiratório humano associados ao resfriado comum. No ano seguinte, 1967, a partir do lavado da nasofaringe de um paciente com sintomas gripais, foi descoberto o HCoV-OC43 (McIntosh et al., 1967). Em novembro de 2002 uma epidemia de doença respiratória causada pelo SARS-CoV teve origem na província de Guangdong, no sul da China, e acabou se espalhando para outros países da Ásia, além da América do Norte e Europa. Em 2004, na Holanda, foi isolado o HCoV-NL63 de amostras de uma menina de 7 meses que apresentava sintomas de coriza, conjuntivite, febre e bronquiolite (van der Hoek et al., 2004). Já em 2005 o HCoV-HKU1 foi recuperado de um paciente de 71 anos de Hong Kong com pneumonia (Woo et al., 2004). Em 2012 o MERS-CoV foi isolado de um paciente de 60 anos com pneumonia na Arábia Saudita (Zaki et al., 2012), depois foi visto que o patógeno é endêmico na Península Arábica. E por fim, no final de 2019, casos de pneumonia causada por SARS-CoV-2 foram relatados em Wuhan, China, e já em 11 de fevereiro de 2020 a doença COVID-19 foi declarada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Faye et al. 2021; Liu et al. 2021; Su et al. 2016). Portanto, as ocorrências de SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 devem nos alertar para a possibilidade de emergência de novos CoVs por spillover de animais para humanos (Su et al. 2016). A emergência de vírus zoonóticos como causa de epidemias não é algo novo e está se tornando mais frequente, facilitado pela criação e comércio de animais selvagens. Além disso, atividades florestais de desmatamento e mineração aumentam as chances de contato com patógenos que parasitam outros animais, como morcegos. Sabe-se que alfa e betacoronavírus já foram encontrados em 14 de 21 famílias de morcegos presentes em seis continentes, e em pelo menos 69 países (Ruiz-Aravena et al. 2022). Os dados de sequência disponíveis indicam que todos os coronavírus humanos tenham origem animal, especificamente, HCoV-NL63 e HCoV-229E tiveram origem em morcegos, enquanto HCoV-OC43 e HKU1 talvez tenham origem em roedores. (Cui et al. 2019; Ye et al., 2020) (Figura 2).

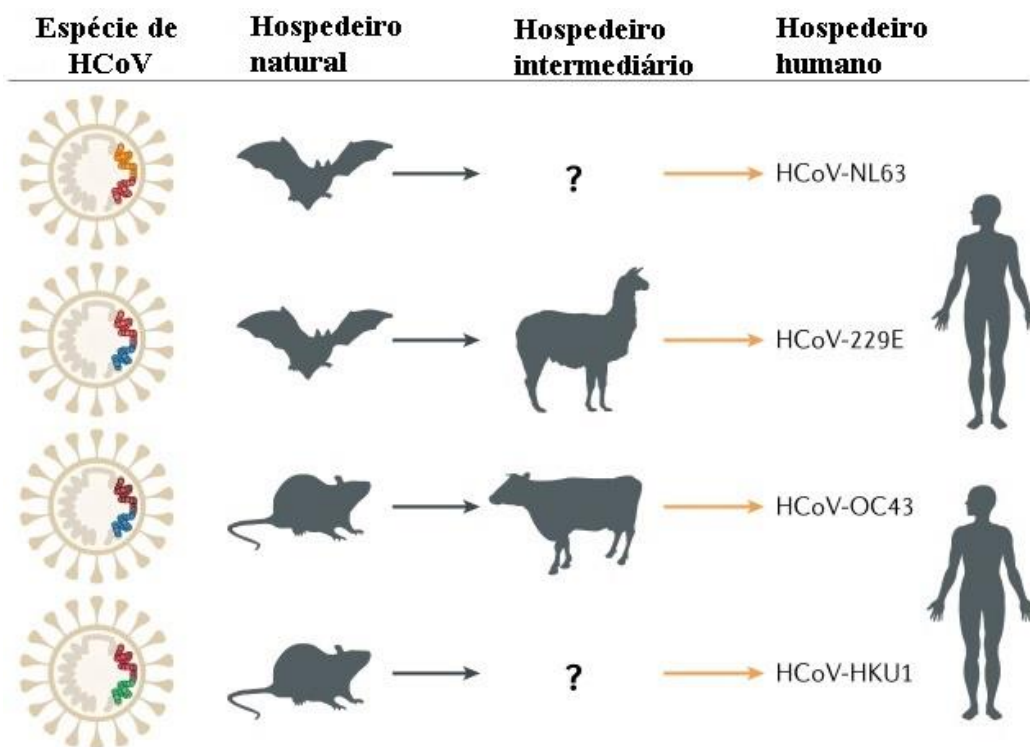


Figura 2: Hospedeiros de diferentes coronavírus. Os antecessores dos vírus -229E e -NL63 foram encontrados em morcegos africanos e camelídeos são considerados hospedeiros intermediários da espécie -229E. HCoV-OC43 e -HKU1 se originaram de roedores. Setas cinzas: spillovers para hospedeiros intermediários; setas laranjas: spillovers para seres humanos (Adaptado de: Cui et al. 2019).

A Tabela 1 resume a epidemiologia e patogênese de cada HCoV. Esses vírus geralmente infectam crianças e resultam em infecções leves do trato respiratório superior. Os sintomas podem incluir rinorreia, congestão nasal, dor de garganta e febre (Su et al. 2016; Faye et al. 2021).

Tabela 1: Sintomas clínicos de cada um dos quatro coronavírus sazonais

Espécie HCoV	Sintomas clínicos	Período de Incubação
229E	<ul style="list-style-type: none"> • Mal-estar geral; • Dor de cabeça; • Corrimento nasal; • Espirros; • Dor de garganta; • Febre e tosse; (10-20% dos pacientes)	2 - 5 dias
OC43	<ul style="list-style-type: none"> • Mal-estar geral; • Dor de cabeça; • Corrimento nasal; • Espirros; 	

	<ul style="list-style-type: none"> • Dor de garganta; • Febre e tosse; <p>(10-20% dos pacientes)</p>	2 - 5 dias
NL63	<ul style="list-style-type: none"> • Tosse, rinorreia; • Taquipneia; • Febre; • Hipóxia; • Laringite obstrutiva (crupe) 	2 - 4 dias
HKU1	<ul style="list-style-type: none"> • Febre; • Nariz escorrendo; • Tosse; • Dispneia (dificuldade respiratória) 	2 - 4 dias

1.2 - Estrutura Viral

Os HCoV têm genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (RNA+) de 32 kb, estrutura aproximadamente esférica, com cerca de 125 nm de diâmetro, envelope com glicoproteínas de superfície em formato de espícula, denominadas de proteínas S (do inglês spike) (ATZRODT et al., 2020) (Figura 3). As principais proteínas estruturais do vírus são a spike (S), a proteína de membrana (M), a proteína de envelope (E), e a proteína do nucleocapsídeo (N), todas codificadas na porção 3' terminal do genoma (MALIK et al., 2020).

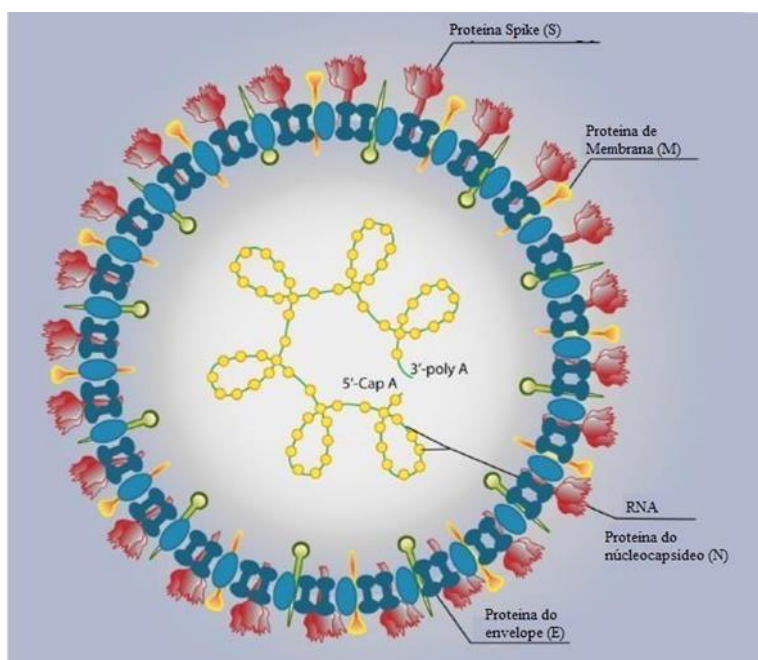


Figura 3: Representação esquemática da estrutura de

coronavirus. (Adaptado de OLWENYI et al., 2020).

A proteína S é uma proteína de fusão de classe I que forma homotrímeros e é clivada por proteases do hospedeiro em duas porções: S1, que age como ligante do receptor na membrana da célula, e S2 que contém o domínio de fusão de membrana (LIU, et al., 2020). A proteína de Membrana (M), além de ser a mais abundante proteína estrutural, determina a forma do envelope viral (ATZRODT et al., 2020). Homodímeros da proteína M interagem com outras proteínas virais na montagem da partícula viral, e esta proteína possivelmente contribui para a patogênese viral, como por exemplo na indução de Interferon tipo I dependente de RIG-1, observada em células superexpressando a proteína M de SARS-CoV, mas não em HCoV-HKU1 (LIU, et al., 2020). A proteína E tem participação nos processos de montagem e brotamento (MALIK et al., 2020), e forma homopentâmeros com atividade de canal iônico (LIU, et al., 2020). A nucleoproteína N forma dímeros que se ligam ao RNA genômico e também montam o nucleocapsídeo (MALIK et al., 2020). O RNA genômico tem 14 ORFs separadas por sequências que contêm sinais para transcrição de RNAs subgenômicos (sgRNA), que são traduzidos nas proteínas estruturais e proteínas acessórias. A ORF 1 abrange cerca de 65% do genoma viral e é formada por duas ORFs parcialmente superpostas, ORF1a e ORF1b, que codificam as poliproteínas pp1a e pp1ab, que são fundamentais na replicação (Figura 5) (MOHAMADIAN et al., 2021). A outra parte do genoma contém as ORFs que codificam as proteínas estruturais do vírus, bem como outras proteínas cuja expressão pode ser diferente entre diferentes HCoVs (Figura 6) (LIU, et al., 2020).

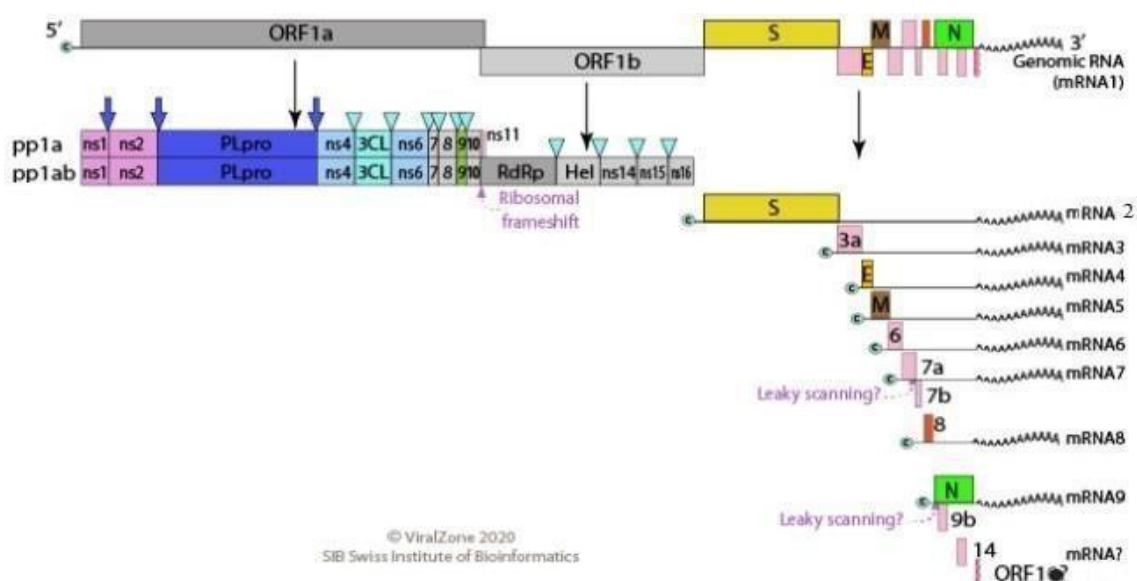


Figura 4: Representação esquemática do genoma de coronavírus (Viralzone, 2020).

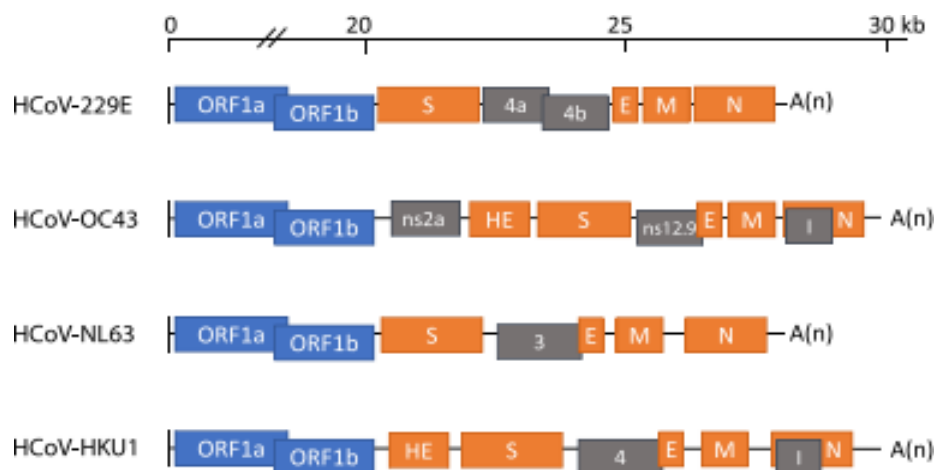


Figura 5: Representação esquemática do genoma de HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1 (LIU, et al., 2020).

1.3 - Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo viral tem início com a ligação da proteína S com o receptor na célula hospedeira. Diferentes receptores já foram descritos para diferentes espécies de coronavírus, e os principais são a aminopeptidase humana N (APN) para HCoV-229E, enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para HCoV-NL63, SARS-CoV e SARS-CoV-2, dipeptil peptidase 4 (DPP4) para HCoV-HKU1, e ácido siálico para HCoV-OC43 (LIU, et al., 2020). Em alguns coronavírus, outras proteínas virais podem servir de ligante para entrada na célula, como o exemplo de HCoV-NL63 que usa a proteína M para se ligar a proteoglicanos como fatores de ligação inicial, para depois ocorrer a ligação da proteína S a ACE2 (LIU, et al., 2020). A entrada de HCoVs nas células depende de clivagem proteolítica da proteína S. O HCoV-229E pode entrar tanto mediante ação da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), quanto da catépsina L endossomal. Após a entrada, há tradução das ORFs 1a e 1b do RNA genômico para originar a replicase viral (LIU, et al., 2020). A presença de um pseudo-nó e de uma sequência escorregadia de RNA (slippery sequence) próximo ao final da ORF1a, ocorre uma alteração de quadro de leitura (frameshift), permitindo a tradução contínua da ORF1b, produzindo então a poliproteína pp1ab (LIU, et al., 2020). As poliproteínas sofrem autoclivagens proteolíticas, dando origem a 16 proteínas não estruturais (nsp), responsáveis por formar os complexos de replicação e transcrição (V'KOVSKI et al., 2021). A Nsp1, a mais próxima da região N-terminal, tem papel na resposta de IFN do hospedeiro (LIU, et al., 2020). Nsp3 codifica a protease papaína-like (PLPro), que cliva as nsp 1, 2 e 3. A nsp5 é uma protease, que cliva pp1a e pp1ab em onze locais, produzindo um total de treze

proteínas importantes para a replicação do vírus. A nsp6 ativa a formação de autofagossomos e, junto com as nsp3 e nsp4 reestruturam as membranas da célula para formar vesículas de membrana dupla que constituem plataformas de montagem de HCoVs. No HCoV-229E, as proteínas nsp7 e nsp8 sintetizam fitas curtas de RNA (cerca de 6 nucleotídeos) que podem agir como cofator para a atividade da RNA polimerase RNA-dDependente (RdRP) (nsp12). A nsp9 é uma proteína de ligação a DNA/RNA, e a nsp10 é uma proteína com domínio zinc finger. As proteínas nsp7, 8, 9 e 10 estão relacionadas à formação do complexo de replicação em torno da polimerase RdRP, que é a nsp12. A proteína nsp13 é responsável por separar fitas duplas no complexo replicativo, a fim de gerar templates de fita simples e a nsp14 tem atividades 3' exonuclease e de N7-metiltransferase, colaborando no capeamento de mRNAs. A função 3' exonuclease da nsp14 tem importante papel reduzindo taxas de erros de transcrição, uma função ausente nos demais vírus de RNA+, aumentando a fidelidade da replicação. A nsp15 age como endoribonuclease e antagonista de interferon I, e a nsp16 tem atividade 2'-O-metiltransferase (LIU, et al., 2020). A replicação, transcrição e tradução ocorrem em fábricas virais (V'KOVSKI et al., 2021) e as proteínas associadas ao envelope do vírus (S, M e E) são traduzidas no retículo endoplasmático (RE), enquanto que proteínas não-glicosiladas (a N, por exemplo) são traduzidas em ribossomos livres, e a montagem dos vírions tem forte papel da proteína M. O processo termina com o brotamento e transporte dos vírions em vesículas nas membranas do RE e do ERGIC (compartimento intermediário entre RE e o Golgi), com liberação dos vírus por exocitose pela via secretória (LIU, et al., 2020). Além das proteínas estruturais, os HCoVs também codificam várias proteínas acessórias exclusivas em comparação com outras espécies e gêneros de coronavírus. Por exemplo, HCoV-229E tem as proteínas 4a e 4b, HCoV-OC43 tem ns2a, ns12.9 (também conhecida como ns5a) e proteína I (também chamada de N2 ou proteína ORF interna), HCoV-NL63 tem a proteína 3 e HCoV-HKU1 tem as proteínas 4 e I. Embora essas proteínas acessórias não sejam essenciais para a replicação viral em cultura de células, sugere-se que elas possam desempenhar um papel na patogênese viral, afetando a gravidade da infecção (LIU, et al., 2020).

1.4 - Tonsilas

As tonsilas são órgãos linfo-epiteliais localizados na orofaringe, constituindo o anel de Waldeyer, que desempenha importante papel no início de respostas imunes contra antígenos que entram pelas vias respiratória e digestória (Nave et.al 2001; Jovic et. al 2015). Tonsilas têm compartimentos teciduais que incluem o epitélio, inclusive o epitélio reticulado das criptas, folículos linfóides e tecido linfóide interfolicular (Figura 6). Tais compartimentos têm funções especializadas, como interação e captação de antígenos exógenos, montagem de resposta imune, produção de anticorpos e circulação de linfócitos (Jovic et.al 2015). Nas tonsilas há células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas, e linfócitos B e T capazes de reconhecer antígenos específicos. Frente a uma infecção o sistema imunológico responde de duas maneiras: a resposta primária à primeira exposição, e a resposta secundária anamnésica, desencadeada por exposições subsequentes. Células de memória importantes para a resposta anamnésica permanecem no organismo para protegê-lo em futuros encontros com o mesmo patógeno, o que desempenha papel crucial na defesa do corpo contra invasores (Niedzielski et al. 2023). É sabido que tonsilas humanas podem abrigar vírus de DNA replicantes, como adenovirus (Proenca-Modena et al., 2019) e bocavirus (Proenca-Modena et al., 2014). Além disso, genomas de diversos vírus de RNA, inclusive dos coronavírus endêmicos, são detectáveis nos tecidos tonsilares (Proenca-Modena et al., 2012).

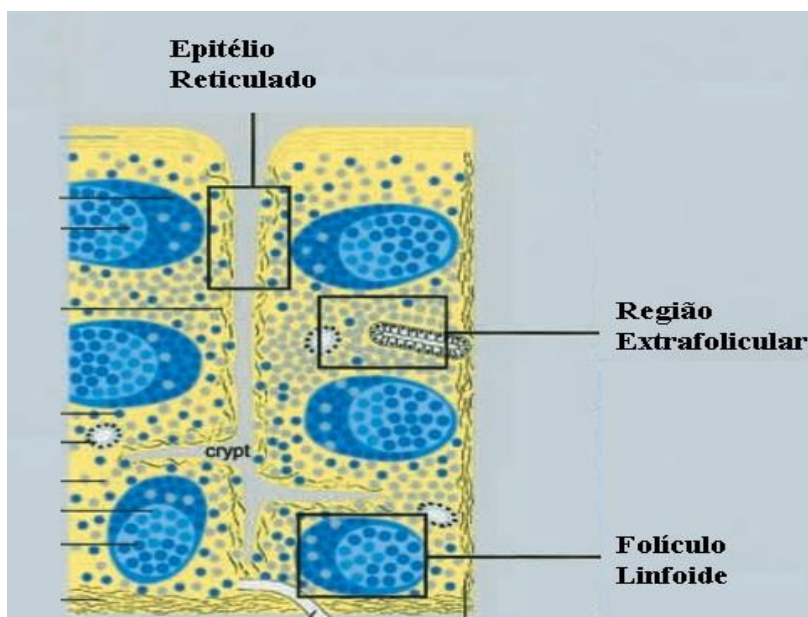


Figura. 6: Representação esquemática das principais regiões das tonsilas (Adaptado de: Nave et.al 2001).

2 – JUSTIFICATIVA

Ainda existem importantes lacunas de informações relativas à interação entre os HCoV's e células de órgãos linfóides secundários, tais como a identificação dos tipos celulares suscetíveis à infecção por HCoV nesses tecidos, o desfecho da infecção quanto ao destino da célula persistentemente infectada. Portanto, este projeto se destaca pela sua relevância, particularmente em relação à presença contínua de coronavírus nas tonsilas, que podem potencialmente servir como reservatório de vírus infecciosos. Nesse sentido, a detecção de HCoV's endêmicos nos tecidos das tonsilas estabelece uma base sólida para futuras investigações aprofundadas acerca dos detalhes dessa infecção.

3 – OBJETIVO

O presente projeto visa a investigar se há infecção por HCoV's endêmicos em tecidos linfóides secundários, e quais são os tipos celulares infectados.

3.1 - Objetivos Específicos

- Detectar genoma de HCoV's endêmicos por RT-PCR em tecidos linfóides humanos.
- Estudar a distribuição in situ de HCoV's em tecidos linfóides por imunohistoquímica e os tipos celulares infectados.
- Realizar o isolamento de HCoV's a partir de tecidos tonsilares positivos para HCoV.
- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes homólogos e verificar seu efeito neutralizante para SARS-CoV-2.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Coleta e processamento de amostras de tonsilas humanas

Para este estudo, foram utilizadas amostras de biópsias de amígdalas e adenoides, e swabs nasais que foram coletados de crianças com idade entre 3 e 11 anos submetidas à cirurgia de tonsilectomia, após diagnósticos de hipertrofia tonsilar. Além disso, esses pacientes não apresentaram sintomas de infecção respiratória aguda nos 30 dias que antecederam a cirurgia. As cirurgias foram realizadas pela equipe de otorrinolaringologia do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, de acordo com o protocolo previamente aprovado pelo CEP, com o consentimento dos responsáveis legais. As amostras foram armazenadas em um meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 4% de solução antibiótico/antimicótico (AB/AM), até serem encaminhados ao laboratório para processamento. Os fragmentos de tecido foram inicialmente lavados com PBS e em seguida divididos em várias partes. Um fragmento foi fixado em Carnoy para posterior processo de emblocamento em parafina cuja finalidade são análises de histologia e imunohistoquímica. Além disso, fragmentos de aproximadamente 5 mm foram utilizados para gerar uma dispersão de células por meio de uma dissociação enzimática com uma mistura de dispase (0.6 U/mL) e colagenase (100 U/mL) (Gibco), com incubação a 37°C, sob agitação constante. Em seguida, as células dissociadas foram filtradas através de um filtro de células (Cell strainer Falcon®) com poros de 100 µm para obter uma suspensão celular, que foi posteriormente dividida em dois processos: uma parte foi submetida a um gradiente de densidade Ficoll (Ficoll-Paque®) para separação de PBMC, enquanto a outra parte foi armazenada em TRIzol (Sigma-Aldrich®), RNA later (Invitrogen), e meio de transporte viral (VTM) para uso em estudos adicionais. Todas as alíquotas preparadas foram armazenadas a -80°C. As células submetidas a separação por gradiente de Ficoll foram colocadas em tubos Falcon acrescidos de solução Ficoll (2:1), centrifugadas primeiramente a 400 × g por 30 minutos a 20°C, com desaceleração 0. Após centrifugação a fração correspondente ao PBMC (Buffy Coat) foi coletada, lavada três vezes em PBS e ressuspensas em meio de congelamento celular contendo RPMI 10%. Já as amostras de swabs em PBS foram submetidas a uma centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi então dividido em duas alíquotas, sendo uma delas armazenada em Trizol e a outra em VTM. O pellet celular resultante foi ressuspensado em PBS 1X, e aplicados em lâminas de microscopia, fixados com acetona e, em seguida,

mantidos a -20°C para análises posteriores utilizando imunofluorescência.

4.2 - Detecção de coronavírus RT-PCR

Os fragmentos de tecidos armazenados em Trizol foram usados para extrair RNA por TRIzol seguindo protocolo do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Com o produto da extração foi feita a transcrição reversa com enzima Multiscribe reverse transcriptase e primers randômicos (Applied Biosystems™). O cDNA resultante da reação foi usado para a RT-PCR pelo kit TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™), com primers e sonda específicos para cada vírus (tabela 2)

Tabela 2. Primers e sondas utilizados para detecção do genoma dos Coronavírus endêmicos e gene endógeno

HCoV	Alvo	Orientação	Sequência (5' → 3')
229E	RdRp	Foward Reverse Sonda	TGGAGCGAGGATCGTGTTT TAGGCTGTGACAGCTTTTGCA FAM-TGTTCTCACGCTGCTGTTGATTCGCT-TAMRA
OC43	RdRp	Foward Reverse Sonda	CGCCGCCTTATTAAGATGTTG GGCATAGCACGATCACACTTAGG FAM-AATCCTGTACTTATGGGTTGGGATT-TAMRA
HKU1	RdRp	Foward Reverse Sonda	GAATTTTGTTGTTACATGGTGATAGA GCAACCGCCACACATAACTATTT FAM-TTTATCGCCTTGCGAATGAATGTGCTC-TAMRA
NL63	N	Foward Reverse Sonda	GCGTGTTCTACCAGAGAGGA CTGTGGAAAACCTTTGGCATC FAM-ATGTTATTCAGTGCTTTGGTCCTCGTGAT-TAMRA
Beta-actina	Beta-actina humana	B-Actina For B-Actina Rev Sonda	CCCAGCCATGTACGTTGCTA TCACCGGAGTCCATCACGAT FAM-ACGCCTCTGGCCGTACCACTGG-TAMRA

A RT-PCR foi realizada em termociclador Step One Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com as composições indicadas (tabela 3), seguindo

os seguintes parâmetros: Fase inicial de 95°C, 2 minutos e 40 ciclos de 95°C, 5 segundos e 60°C, 30 segundos.

Tabela 3. Composição das RT-PCR s

RT-PCR Coronavirus Endêmicos				
	HKU1	229E	OC43	NL63
Taq (µl)	5 (10 µmol)	5 (10 µmol)	5 (10 µmol)	5 (10 µmol)
Foward (µl)	0,25 (0,1 µmol)	1 (0,1 µmol)	0,125 (0,1 µmol)	1 (0,1 µmol)
Reverse (µl)	0,25 (0,1 µmol)	1 (0,1 µmol)	1 (0,1 µmol)	1 (0,1 µmol)
Sonda (µl)	0,125 (0,06 µmol)	0,3 (0,1 µmol)	0,3 (0,06 µmol)	0,3 (0,06 µmol)
H₂O (µl)	2,375	0,7	1,575	0,7

4.3 – Imunohistoquímica Seriada

Cortes de tecido fixado e parafinado de tonsilas positivas para coronavirus sazonais foram testados por IHQ com anticorpos para a proteína N de coronavírus. A técnica de IHQ permite a visualização e localização da proteína N nos tecidos infectados, fornecendo informações sobre a distribuição dos vírus. Para isso, foram usados cortes de 3 µm de espessura, que passaram por desparafinização, reidratação, desmascaramento antigênico com tampão citrato. Após bloqueio da peroxidase endógena, os tecidos foram incubados com anticorpo primário anti-nucleoproteína (N) (Mouse Anti Coronavirus MAB – Merck/Millipore) e ,após lavagem, com com anticorpo secundário IgG biotilado anti-mouse (Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG – Vector). As reações foram reveladas usando o kit AEC (Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 U.S.A.), e a contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA). As lâminas foram montadas com liquido de montagem PBS com glicerol e examinadas em microscópio óptico em campo claro nos aumentos de 100 e 400 vezes, e em seguida escaneadas usando o ScanScope (Aperio Technologies; Vista, CA, EUA) com aumento de 400X para digitalização.

Comprovada a presença viral nos tecidos linfoides secundários, os tipos celulares infectados foram determinados por imunohistoquímica usando a estratégia de marcações seriadas intercalada com apagamento denominada SIMPLE (GLASS; PAPIN;

MANDELL, 2009). O protocolo permite que, após a detecção de um antígeno viral nos tecidos com revelação por AEC, os cortes são desidratados até etanol a 95%, solução na qual permaneces incubados para o completo desaparecimento da marcação de AEC. Após isso, os anticorpos previamente ligados foram eluídos por incubação em solução de 0.15 M KMnO₄/0.01M H₂SO₄ e os cortes foram lavados, seguindo-se marcação com novo anticorpo primário para um outro alvo celular de interesse (tabela 4) seguido de um anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase. Esse processo é repetido para diferentes proteínas, permitindo a análise de múltiplos marcadores em uma única amostra, com apagamentos intercalados. Após cada marcação as lâminas foram escaneadas para geração das imagens virtuais.

Tabela 4. Anticorpos usados para a marcação histoquímica

Fenótipo	Ac Primario
Anti-cd4	Anti-CD4 antibody [EPR19514] (ab183685)
Anti-cd3	Anti-CD3 alpha antibody [EPR21769] (ab217344)
Anti-cd20	Anti-CD20 antibody [SP32] (ab64088)
Anti-cd123	CD123 antibody [EPR24481-20] (ab280355)
Anti-cd68	Anti-CD68 antibody [KP1] (ab955)
Anti-citoqueratina	Anti-pan Cytokeratin antibody [C-11] (ab7753)

4.4 - Propagação de estoques de HcoV

Primeiramente, células Vero E6 foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas

até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%. Os coronavírus endêmicos foram isolados de amostras clínicas positivas gentilmente cedidas pelo Prof^o. Dr^o. Edison Luiz Durigon (ICB/USP). As alíquotas foram homogeneizadas e centrifugadas a 1.000 × g por 10 minutos para eliminar restos celulares, e os sobrenadantes foram diluídos em meio DMEM para a inoculação e de células Vero E6 por 1 hora para adsorção. Em seguida, meio DMEM fresco com 2% de SFB foi repostado, as culturas foram incubadas a 37°C e examinadas diariamente para observar efeito citopático (CPE). Após 5 dias foi observado CPE e foram realizadas passagens subsequentes: sobrenadantes das culturas foram coletados, centrifugados para eliminar células e, em seguida, inoculados em novas culturas de células Vero E6. A confirmação da infecção foi realizada por imunofluorescência nos pellets celulares ressuspensos em PBS.

Os estoques virais obtidos foram titulados pelo ensaio de unidades formadoras de placas de lise (PFU), e os títulos foram expressos em PFU/mL. Células VERO E6 foram cultivadas em placas de 6 poços e infectadas ao atingirem 80% de confluência. Inicialmente as monocamadas foram lavadas com PBS e inoculadas com 1 ml de diluições decimais do inóculo viral em DMEM. Após adsorção sob agitação lenta à temperatura ambiente por 1 hora, foi retirado o inóculo e adicionados 2 ml de overlay de agarose low melting a 0,9% em DMEM, e as placas de cultura incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 5 dias o overlay foi fixado com formaldeído 10%, removido e as culturas lavadas em água corrente. Depois as placas foram coradas com solução de cristal violeta e foi realizada a contagem de PFU.

4.5 – Imunofluorescência

Para realizar-se a imunofluorescência em células, lamínulas fixadas em formaldeído a 4% passaram por 5 lavagens em PBS, foram incubadas em uma solução de permeabilização (0,01% Triton X-100 em PBS) por 15 minutos a 37°C para garantir a entrada dos anticorpos nas células. Após isso, as lamínulas foram lavadas novamente e submetidas a um bloqueio com a solução Super Blocking (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos a 37°C para minimizar reações inespecíficas. As lamínulas foram então incubadas com o anticorpo primário anti proteína N (Mouse Anti Coronavirus MAB – Merck/Millipore) por 1 hora a 37°C, seguido de lavagem em PBS, e incubação por mais 1 hora com o anticorpo secundário Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen). Após a incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS por mais três vezes, e montadas em lâminas contendo solução de

montagem Fluormount G (ElectroMicroscopy).

Para tecidos parafinizados, lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a recuperação antigênica feita solução de citrato acrescida de Triton X-100 para tornar as células permeáveis à entrada de anticorpos, e então aquecidas a 95-98°C por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e tratadas com bloqueio de sítios inespecíficos com SuperBlock comercial por 15 minutos. Após isso as lâminas foram incubadas overnight com o anticorpo primário específico para a proteína N de coronavírus, e para o marcador adequado do fenótipo celular. Foram feitas três lavagens em PBS e adicionado o anticorpo secundário por 1 hora ao abrigo da luz. Após três lavagens em PBS foi realizada a montagem das lâminas.

As imagens resultantes foram adquiridas utilizando um microscópio equipado com ScanScope VS120 e analisadas utilizando os softwares ImageJ e Adobe Photoshop.

4.6 – Ensaio de Neutralização

Considerando que o presente estudo foi feito em parte durante a pandemia de SARS-CoV-2, e que amostras de soro foram colhidas das crianças adeno-tonsilectomizadas, realizamos um teste de neutralização in vitro para averiguar se havia alguma capacidade de neutralização cruzada nesses soros de pacientes positivos para coronavírus endêmicos, mas negativos para SARS-CoV-2. O ensaio de neutralização foi feito em células VERO E6 80 a 90% confluentes, com base em protocolo estabelecido. Em resumo, os soros dos pacientes foram diluídos em série decimal em DMEN e incubados com 10^4 de cada espécie de HCoV sazonais, assim como SARS-CoV-2, por 2 horas a 37° C. Posteriormente, isso foi inoculado em culturas de Vero E6 para verificar a formação de placas, em comparação com soro mock.

5 – RESULTADOS

5.1 - Detecção de genomas de coronavírus endêmicos por RT-PCR em amígdalas e adenoides.

Tabela 5. HCoV sazonais detectados em tonsilas hipertróficas humanas

Amostra	Data da Coleta	Idade (anos)	Sexo	Tecido Linfoide/ Secreção	Virus	Vacinação*
670	03/11/2020	5	F	AMG	NL63	-
672	10/11/2020	3	M	ADN	HKU1	-
				AMG	229E/NL63	
				CB	HKU1	
				LB	229E/HKU1	
673	11/11/2020	10	M	AMG	NL63	-
675	18/11/2020	6	M	CB	229E	-
676	24/11/2020	7	F	AMG	229E	-
681	01/12/2020	8	M	AMG	NL63	-
				ADN	229E/OC43	-
				CB	229E	
683	08/12/2020	8	M	CB	229E	-
684	09/12/2020	6	F	ADN	229E	-
687	15/12/2020	7	M	ADN	229E/HKU1	-
688	15/12/2020	4	F	LB	OC43	-
689	15/12/2020	3	M	ADN	NL63	-
				CB	HKU1	-
690	13/01/2021	11	F	ADN	HKU1	-
				CB	OC43	
691	13/1/2021	6	F	LB	OC43	-
693	10/3/2021	5	M	CB	OC43	-
				LB	229E/OC43	
694	10/3/2021	5	M	CB	OC43	-
697	17/10/2020	4	F	AMG	NL63	-
698	17/10/2020	9	F	ADN	NL63	-
706	20/07/2021	4	F	ADN	OC43	-
721	19/10/2021	7	M	ADN	OC43	-

735	03/05/2022	11	F	AMG	HKU1	2 doses 1ª dose Coronavac (29/01/2022) 2ª dose Coronavac (26/02/2022)
742	28/06/2022	3	M	ADN	229E	S.I
752	06/12/2022	9	M	AMG	HKU1	S.I
760	13/12/2022	4	M	ADN	HKU1	S.I

* O traco (-) indica que até aquele momento não havia começado as campanhas de vacinação. S.I: Sem informação de vacinação.

Foram testadas amostras de tecidos tonsilares de 80 pacientes, dos quais 26 foram positivos para algum dos 4 coronavírus endêmicos em pelo menos um tecido, o que dá uma taxa de positividade de 32,5%. Ou seja, genoma de HCoVs endêmicos são detectados em cerca de um terço de crianças submetidas a adenotonsilectomia na ausência de sintomas de IRA. Em 2 dos pacientes (#672; #681) houve detecção de RNA de HcoV tanto na adenoide quanto na amígdala, resultando em um total de 8 amígdalas e 11 adenoides positivas (Tabela 5). Houve co-infecção de mais de um HcoV em uma amígdala e duas adenoides (#AMG 672; #ADN 681; #ADN 687), e co-infecção de coronavirus endêmicos com SARS-CoV-2 em 10 pacientes. Dentre os quatro HCoVs endêmicos, o mais frequentemente detectado foi OC43 em 10 amostras, e o de menor frequência foi a espécie HKU1 em 7 amostras (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências de HCoVs encontradas nos pacientes

Vírus HCoV	Frequência (%)
OC43	12,5
229E	11,25
NL63	11,25
HKU1	8,75

5.2 – Detecção de proteína estrutural de HCoVs endêmicos por

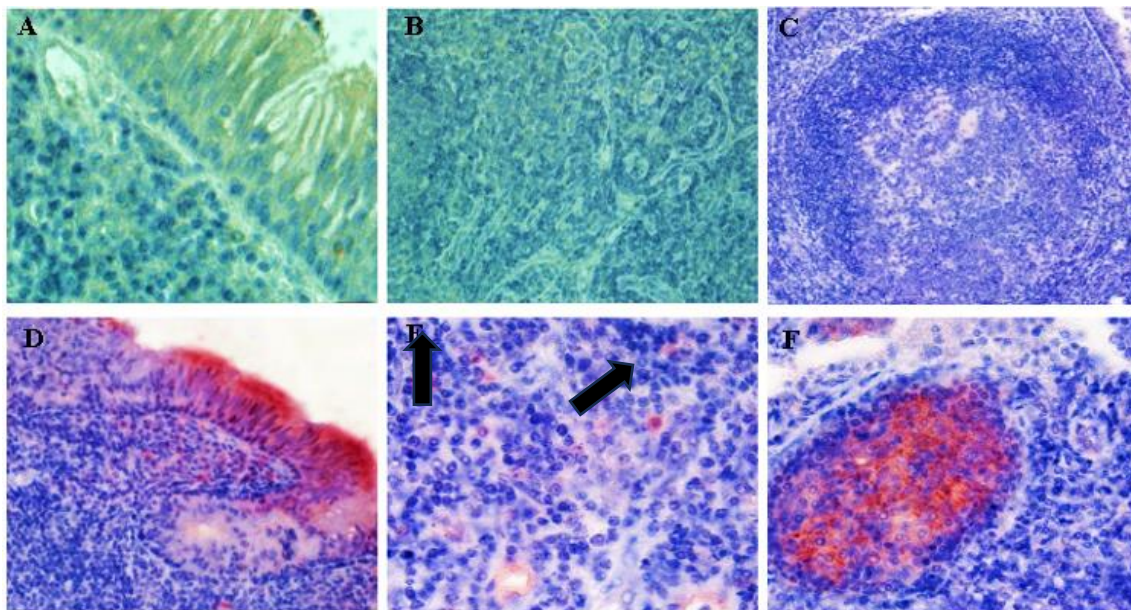
IHQ em amígdalas e adenoides.

Tecidos positivos para HCoV, fixados e incluídos em parafina, foram submetidos a IHQ para detecção e localização da proteína N. Todos os tecidos que testaram positivo para HCoV endêmicos por RT-PCR testaram positivos por IHA para a proteína N. Da mesma forma, tecidos controles negativo por RT-PCR foram negativos à IHQ.

Em 7 tecidos a marcação para a proteína foi mais evidente no epitélio, quanto que nas outras lâminas marcadas, houve detecção mais ampla, abrangendo epitélio de criptas tonsilares e regiões intrafoliculares e extrafoliculares (Figura 7).

Esses resultados mostram que a proteína estrutural N de HCoV endêmicos são produzidas tanto no epitélio como no tecido linfoide, como indicado pela maciça marcação na figura 7F. Assim, não somente RNA genômico viral foi detectado, mas também uma proteína estrutural, sugerindo que há replicação viral no tecido.

Figura 7. Imunohistoquímica para a proteína N de HCoV endêmicos em cortes de tonsilas humanas. A, B e C: campos representativos de tecidos negativos para HCoV por RT-PCR, enfocando epitélio (A), e



parênquima linfoide extrafolicular (B) e folicular (C). D, E e F: Campos representativos de tecidos positivos para HCoV. Marcação epitelial para a proteína N (D), e parênquima linfoide extrafolicular (E) e folicular (F). As setas indicam células individuais expressando a proteína N.

5.3 - Linfócitos B são locais de infecção de HCoV endêmicos

Para determinar os tipos de células infectadas por HCoV nas tonsilas, fizemos IHQ seriada (SIMPLE), utilizando anticorpo anti-proteína N, e em seguida marcadores para os principais imunotipos celulares (tabela 4). Observamos que linfócitos B CD20+ expressam a proteína N de HCoV.

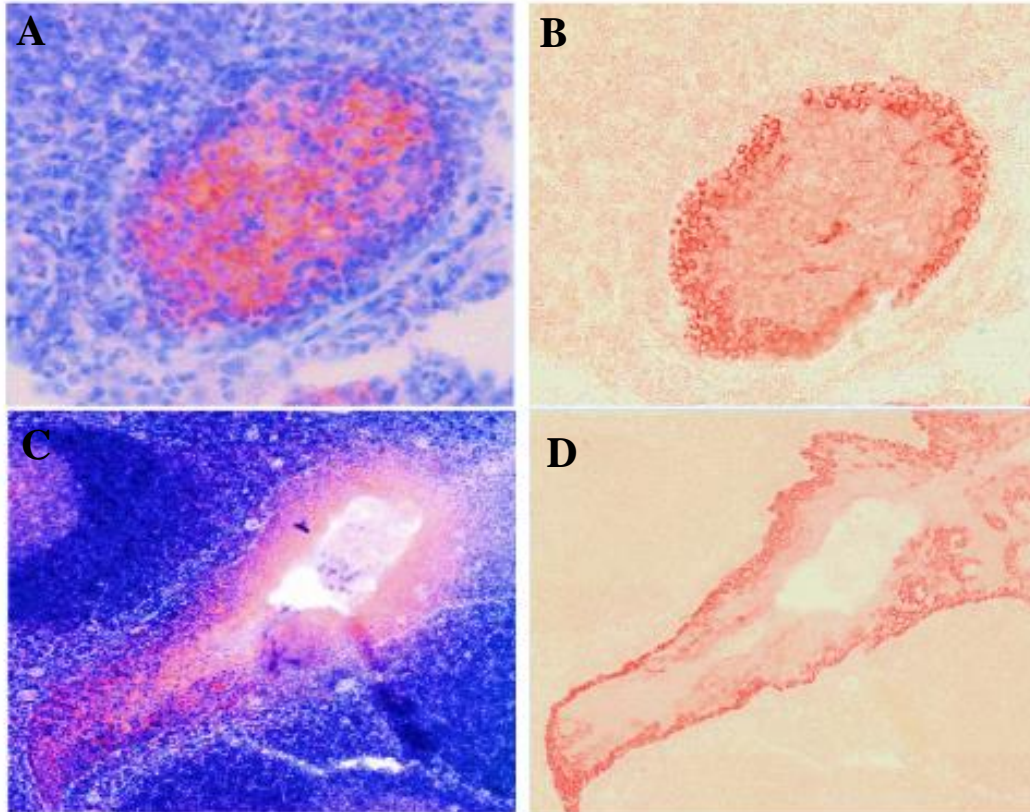


Figura 8. Imunofenotipagem das células infectadas por coronavírus sazonais. A e C: marcação de imunohistoquímica para a proteína N viral. B: Marcação em SIMPLE com anti-mouse CD20. D: Marcação anti-citoqueratina para células epiteliais.

5.4 – Tentativa de Isolamento Viral

Com o objetivo de verificar a presença de HCoV infeccioso nos tecidos, usamos tecidos dissociados e armazenados em VTM para inocular células VERO E6, e monitoramos as culturas por 5 dias, após o que foram feitas mais três passagens cegas. Posteriormente, as células foram coletadas, depositadas em lâminas e fixadas em acetona fria para testar por IF para a proteína N de HCoV o coronavírus. Não obtivemos nenhum isolamento a partir das amostras HCoV-positivas, o que sugere a ausência de produção de progênie viral. Todavia, tentativas adicionais devem ser feitas em outras linhagens celulares, inclusive de origem humana.

5.5 - A isolamento e propagação de estoque viral

Os estoque virais cedidos pelo Profº. Drº. Edison Durigon foram propagados e após três passagens cegas foram coletados e em seguida titulados, obtendo-se uma quantidade de vírus referente à $10^4/100\mu\text{l}$. Para a confirmação do isolamento, além do efeito citopático (Figura 9), foi realizado também ensaios de imunofluorescência (Figura 10).

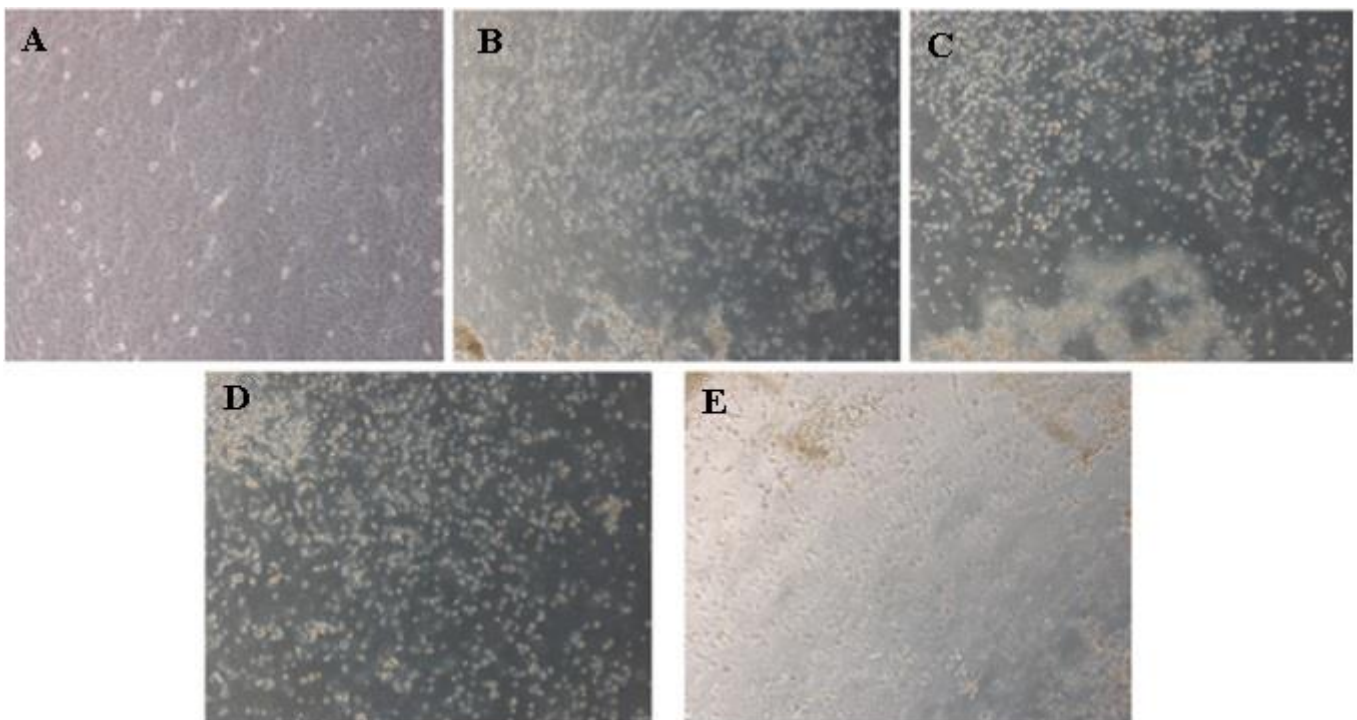


Figura 9: Efeito citopático após 3 passagens cegas: A: Mock. B-E: Infecções com 229E, HKU1, NL63 E OC43, respectivamente. 120h.p.i

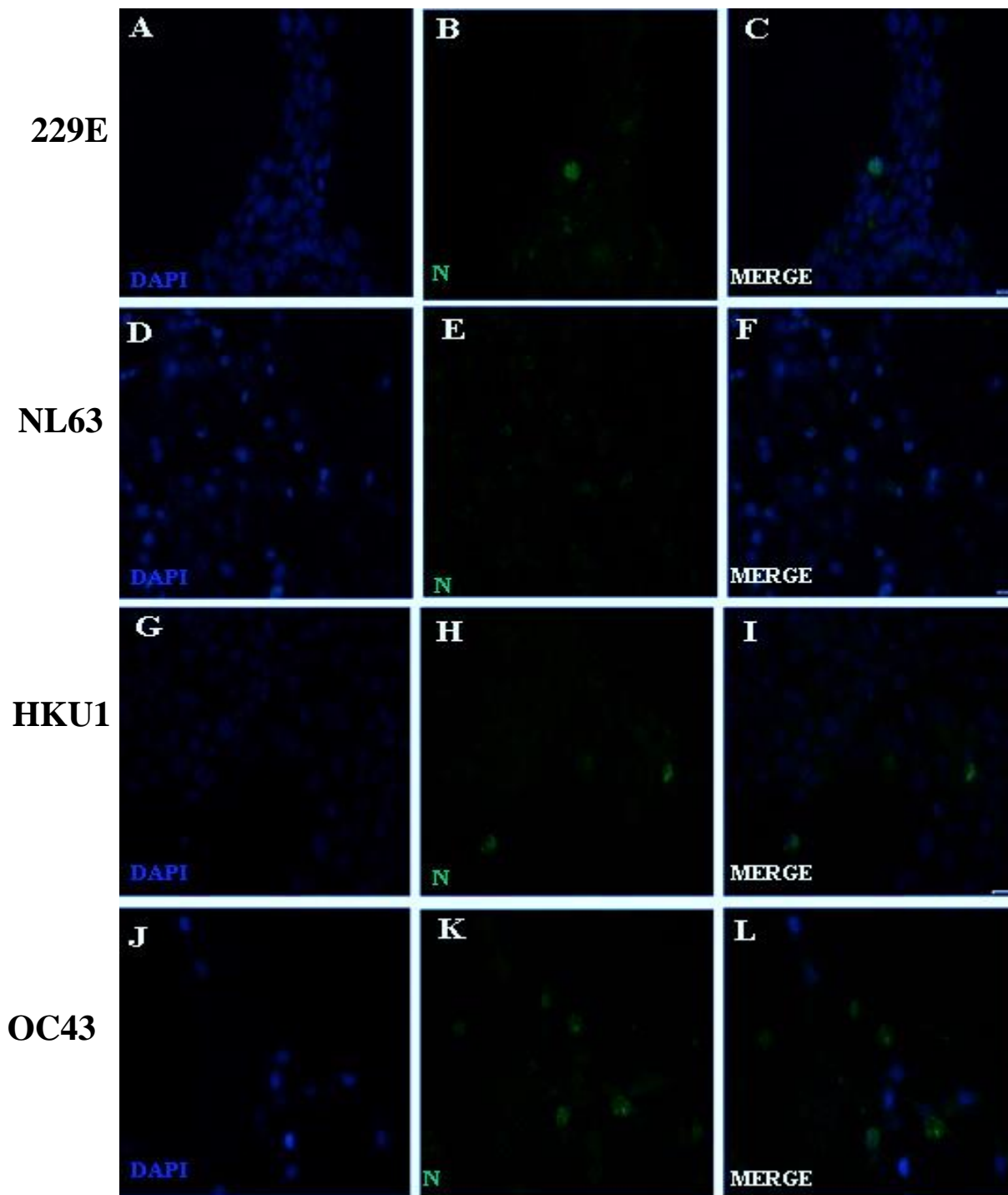


Figura 10: Imunofluorescência para confirmar o isolamento e propagação de HCoV. A, D, G, J: Marcação com DAPI evidando os núcleos celulares. B, E, H, K: Marcação da Núcleoproteína. C,F, I, L: Sobreposição das imagens.

5.6 - Ensaios de neutralização dos soros de pacientes com HCoVs endêmicos

Os ensaios de neutralização contra os HCoVs homólogos indicaram a presença de anticorpos específicos em diluições de até 1:128 (Figura 11), sugerindo a soros conversão dos pacientes, e inclusive com capacidade neutralizante. Porém, os ensaios de neutralização de SARS-CoV-2 pelos soros de pacientes com HCoVs endêmicos mostraram pouca ou nenhuma capacidade neutralizante (Figura 12), com a possível exceção do soro para HCoV-229E, que chega a uma neutralização de 50% na diluição 1:64.

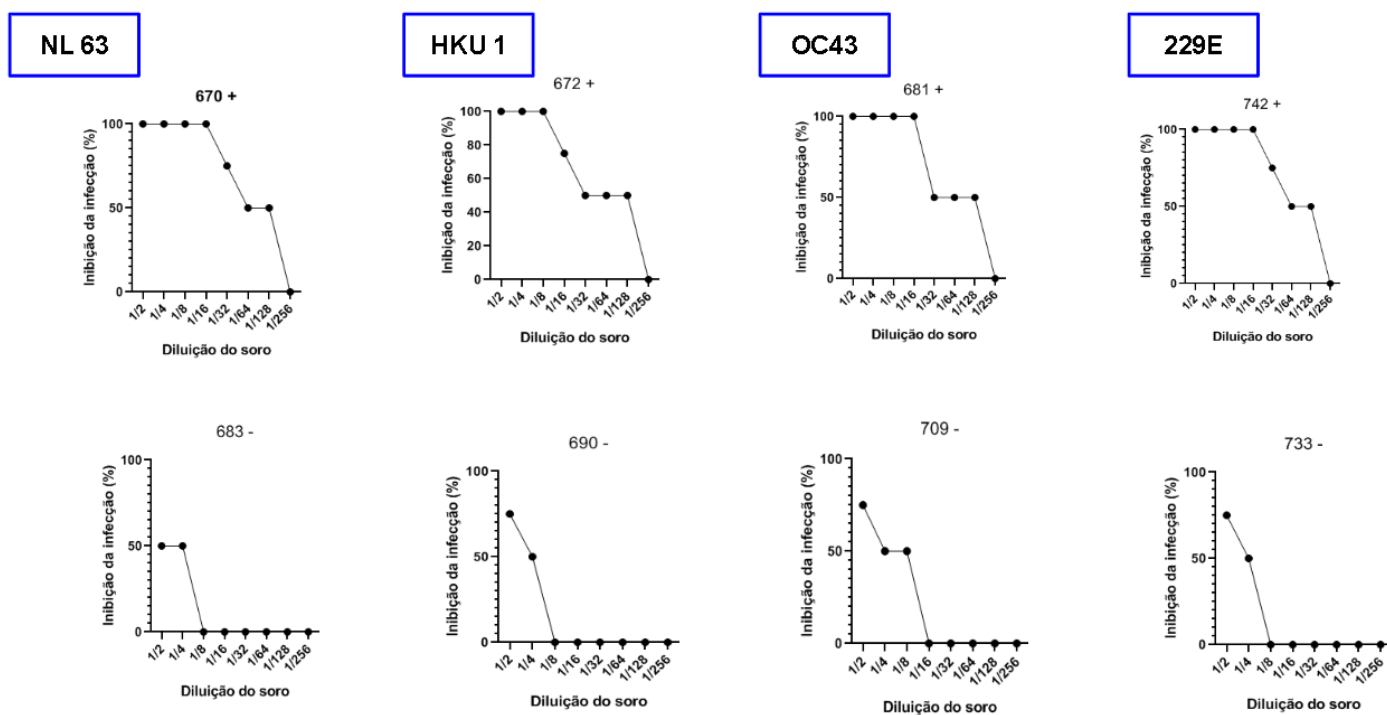


Figura 11: Ensaio de neutralização para HCoVs sazonais. Foram usadas amostras positivas para os HCoV sazonais, e negativas para SARS-CoV-2. Os controles negativos foram feitos com amostras de soros negativas para quaisquer coronavírus.

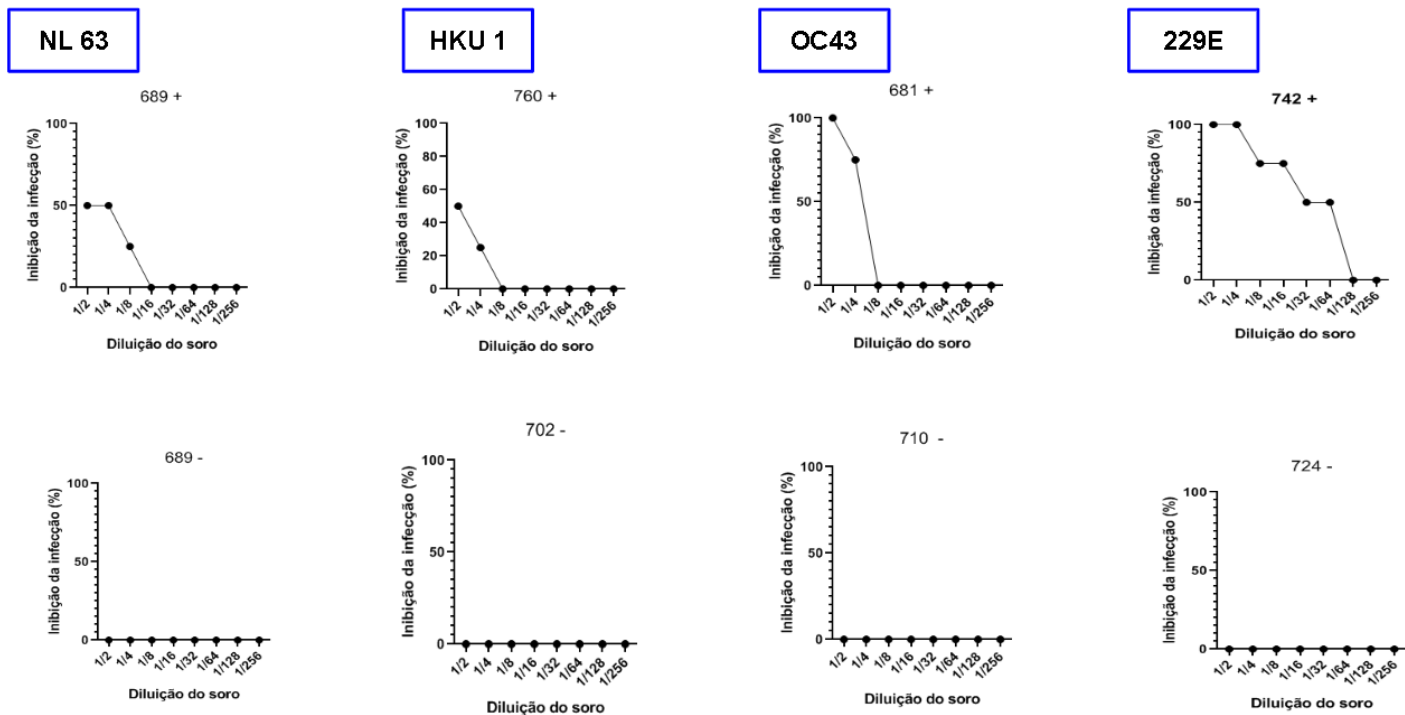


Figura 12: Ensaio de neutralização para SARS-CoV-2. Foram usadas amostras positivas para os HCoV sazonais, e negativas para SARS-CoV-2. Os controles negativos foram feitos com amostras de soros negativas para quaisquer coronavírus.

6 – DISCUSSÃO

As infecções causadas por HcoVs endêmicos são difíceis de diagnosticar clinicamente, pois os sintomas são inespecíficos e comuns a muitas etiologias. A detecção de HCoV por métodos moleculares é de difícil acesso nos serviços de saúde, o que resulta em desconhecimento da frequência desses agentes na população. Além disso, HCoVs podem ser detectados em indivíduos assintomáticos (Ding X Liu, Jia Q Liang, and To S Fung).

Nosso grupo de pesquisa já relatou a detecção por RT-PCR dos HCoVs NL63, HKU1, 229E e HKU1 em secreções e tecidos tonsilares de crianças submetidas à tonsilectomia para tratamento de hipertrofia tonsilar (Proença-Modena et al, 2012). A detecção de genoma de coronavírus endêmicos no presente estudo, portanto, reitera nossos achados anteriores (PROENÇA-MODENA et al., 2012; PROENÇA-MÓDENA et al., 2014).

HCoVs endêmicos são detectados em 15% a 30% das infecções respiratórias (Augusto,

D.G. et al, 2023; Ljubin-Sternak S et. al, 2021), faixa na qual se situa a frequência de 23,75% que encontramos neste estudo em pacientes sem sintomas de IRA.

Quanto à distribuição relativa das quatro espécies de HCoVs, esta tem sido variável nas diversas regiões do mundo. Nas regiões leste e oeste da África, bem como na América do Sul, o vírus 229E tem sido mais frequente, enquanto NL63 predomina principalmente na região leste da África (Flodgren (Flodgren GM, et.al, 2022.)). A espécie OC43 predomina no sul da África, e HKU1 é predominante no Sul da Ásia (Flodgren GM, et.al, 2022.)). Em estudo anterior nosso de lactentes hospitalizados com IRA, o HCoV OC43 foi o mais frequente (Matsuno et al., 2019).

Além da detecção de genomas de HCoV, que poderia ser interpretada como indicativa de detecção de mero remanescente de RNA nos tecidos, o presente estudo adicionou o dado da detecção de proteínas virais nesses tecidos, bem como definiu o tipo e distribuição das células infectadas. Neste sentido, vimos que a maioria das células infectadas são linfócitos B intrafoliculares, mas evidenciamos a presença de proteína viral nos três compartimentos dos tecidos: epitelial, linfóide extra-folicular e linfóide folicular.

Os folículos linfóides são importantes pois ali ocorre a ativação e a proliferação de células B, o que resulta na produção de anticorpos. Quando ativados, linfócitos B se tornam células efetoras responsáveis pela produção e liberação de anticorpos neutralizantes (Jovic et.al 2015; Niedzielski et al. 2023) e atuam como células apresentadoras de antígeno, desempenhando papel na geração de respostas de células T (Niedzielski et al. 2023). Assim, a infecção de grande número dessas células por HCoVs pode resultar em alguma incapacidade dessas células na montagem de respostas a diferentes antígenos, o que deve depender da especificidade antigênica dessas células, o que não é sabido. Neste aspecto, não sabemos também se as células B infectadas são de um mesmo clone, ou de diferentes clones, o que deve ser objeto de futura investigação.

A tentativa de isolamento viral foi infrutífera, talvez por baixa produção de carga viral, ou por baixa susceptibilidade de células Vero-E6 a vírus extraídos de macerados de tecidos. Assim, ainda não podemos afirmar com certeza que não há nenhuma formação de vírus infecciosos nesses tecidos.

Este é o primeiro estudo a mostrar a presença de proteína estrutural de HCoVs em tonsilas humanas naturalmente infectadas. Os dados apresentados sugerem a presença de infecção prolongada ou persistente, assintomática, nesses tecidos tonsilares, o que é corroborado pela soroconversão, com presença de anticorpos homólogos neutralizantes nos soros das

crianças, indicando que de fato elas sofreram uma infecção prévia por esses agentes.

7- CONCLUSÃO

- Genoma e antígeno de HCoV_s endêmicos são detectados em amígdalas e adenoides de aproximadamente um terços de crianças sem sintomas de IRA.
- Células epiteliais e linfócitos B são os principais tipos celulares infectados por HCoV_s nas tonsilas.
- Anticorpos produzidos por infecções por HCoV_s endêmicos são neutralizantes para os tipos homólogos, mas não para SARS-CoV-2.

8 – REFERÊNCIAS

ATZRODT, Cassandra L. et al. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS- CoV-2. The FEBS journal, v. 287, n. 17, p. 3633-3650, 2020.

AUGUSTO, D.G., Murdolo, L.D., Chatzileontiadou, D.S.M. et al. A common allele of HLA is associated with asymptomatic SARS-CoV-2 infection. Nature 620, 128–136 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06331-x>

CASCELLA M, Rajnik M, Aleem A, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Updated 2023 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

COSTA LF, Da Silveira HL, Queiróz DAO, Mantese OC, Yokosawa J. Respiratory virus infections in hospitalized and non-hospitalized children: determinants of severe course of the disease. J Infect Dev Ctries. 2022 Jan 31;16(1):196-205. doi: 10.3855/jidc.15117. PMID: 35192538.

CUI J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Mar;17(3):181-192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9. PMID: 30531947; PMCID: PMC7097006"

FAYE, M.N.; Barry, M.A.; Jallow, M.M.; Wade, S.F.; Mendy, M.P.; Sy, S.; Fall, A.; Kiori, D.E.; Ndiaye, N.K.; Goudiaby, D.; et al. Epidemiology of Non-SARS-CoV2 Human Coronaviruses (HCoV) in People Presenting with Influenza-like Illness (ILI) or Severe Acute Respiratory Infections (SARI) in Senegal from 2012 to 2020. *Viruses* 2023, 15, 20. <https://doi.org/10.3390/v15010020>

FLODGREN GM, Steiro A, Brurberg K, Rose C. Prevalence of common human coronavirus (HCoV) infections: a rapid review [Forekomst av vanlige humane koronavirusinfeksjoner: en hurtigoversikt] –2022. Oslo: Folkehelseinstituttet, 2022.

GALANTI M et al (2019). Rates of asymptomatic respiratory virus infection across age groups. *Epidemiology and Infection* 147, e176, 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000505>.

Hamre, D.; Procknow, J. J. (1966). "A new virus isolated from the human respiratory tract". *Experimental Biology and Medicine*. immune response in adenoids and tonsils. *International archives of allergy and immunology*, v. 122, n. 1, p. 8- 19, 2000.

JENNA J. Guthmiller Patrick C. Wilson ,Remembering seasonal coronaviruses.*Science*370,1272-1273(2020).DOI:10.1126/science.abf4860

JOVIC M, Avramović V, Vlahović P, Savić V, Veličkov A, Petrović V. Ultrastructure of the human palatine tonsil and its functional significance. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(2):371-7. PMID: 26193201.

Lima, T.M. et al. (2023) ‘Tonsils are major sites of persistence of SARS-COV-2 in children’, *Microbiology Spectrum*, 11(5). doi:10.1128/spectrum.01347-23.

LIU DX, Liang JQ, Fung TS. Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63, and -HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of Virology.* 2021:428–40. doi: 10.1016/B978-0-12-

809633-8.21501-X. Epub 2021 Mar 1. PMID: PMC7204879.

LJUBIN-STERNAK S, Meštrović T, Lukšić I, Mijač M, Vraneš J. Seasonal Coronaviruses and Other Neglected Respiratory Viruses: A Global Perspective and a Local Snapshot. *Front Public Health*. 2021 Jul 5;9:691163. doi: 10.3389/fpubh.2021.691163. PMID: 34291031; PMCID: PMC8287126.

M. Knipe, P. M. Howley, and J. I. Cohen (Philadelphia, PA: LippincottWilliams &Wilkins).

MALIK, Yasmin A. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, v. 42, n. 1, p. 3-11, 2020.

MASTERS, P. S., and Perlman, S. (2013). "Coronaviridae," in *Fields Virology*, eds D.

MATSUNO, Alessandra K. et al. Human coronavirus alone or in co-infection with rhinovirus C is a risk factor for severe respiratory disease and admission to the pediatric intensive care unit: a one-year study in Southeast Brazil. *PLoS One*, v. 14, n. 6, p. e0217744, 2019.

McIntosh, K.; Dees, J. H.; Becker, W. B.; Kapikian, A. Z.; Chanock, R. M. (1967). "Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 57 (4): 933–940. Bibcode:1967PNAS...57..933M. doi:10.1073/pnas.57.4.933. PMC 224637. PMID 5231356

MOHAMADIAN, Malihe et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The journal of gene medicine*, v. 23, n. 2, p. e3303, 2021.

NAVE H, Gebert A, Pabst R. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol (Berl)*. 2001 Nov;204(5):367-73. doi: 10.1007/s004290100210. PMID: 11789984.

NIEDZIELSKI A, Chmielik LP, Mielnik-Niedzielska G, Kasprzyk A, Bogusławska J. Adenoid hypertrophy in children: a narrative review of pathogenesis and clinical relevance. *BMJ Paediatr Open*. 2023 Apr;7(1):e001710. doi: 10.1136/bmjpo-2022-

001710. PMID: 37045541; PMCID: PMC10106074.

PROENÇA-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, n. 8, p. e42136, 2012.

Proenca-Modena JL, de Souza Cardoso R, Criado MF, Milanez GP, de Souza WM, Parise PL, Bertol JW, de Jesus BLS, Prates MCM, Silva ML, Buzatto GP, Demarco RC, Valera FCP, Tamashiro E, Anselmo-Lima WT, Arruda E. Human adenovirus replication and persistence in hypertrophic adenoids and palatine tonsils in children. *J Med Virol*. 2019 Jul;91(7):1250-1262. doi: 10.1002/jmv.25441. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30815882; PMCID: PMC7166372.

Proença-Modena JL. Hypertrophic adenoid is a major infection site of Human Bocavirus 1. *Journal of clinical microbiology*. Washington, DC : American Society for Microbiology, 2014. Vol. 52, n. 8 (Aug., 2014), p. 3030-3037.

RUIZ-ARAVENA, M., McKee, C., Gamble, A. et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat Rev Microbiol* 20, 299–314 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>

SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. *Immunity*, 2020.

SU S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*. 2016 Jun;24(6):490-502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27012512; PMCID: PMC7125511.

TAI C-C et al., Detection of respiratory viruses in adults with respiratory tract infection using a multiplex PCR assay at a tertiary center, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.020>

TROY NM, Bosco A. Respiratory viral infections and host responses; insights from genomics. *Respir Res*. 2016 Nov 21;17(1):156. doi: 10.1186/s12931-016-0474-9. PMID:

27871304; PMCID: PMC5117516.

Tyrrell, D.A.J.; Bynoe, M.L. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *BMJ*, 1965, 1(5448), 1467-1470. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.5448.1467>
PMID: 14288084

V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

VAN KEMPEN, M. J. P.; RIJKERS, G. T.; VAN CAUWENBERGE, P. B. The van der Hoek, Lia; Pyrc, Krzysztof; Jebbink, Maarten F.; Vermeulen-Oost, Wilma; Berkhout, Ron J. M.; Wolthers, Katja C.; Wertheim-van Dillen, Pauline M. E.; Kaandorp, Jos; Spaargaren, Joke; Berkhout, Ben (April 2004). "Identification of a new human coronavirus". *Nature Medicine*. 10 (4): 368–373. doi:10.1038/nm1024. ISSN 1546-170X. PMC 7095789. PMID 15034574

Woo, P. C. Y.; Lau, S. K. P.; Chu, C.-m.; Chan, K.-h.; Tsoi, H.-w.; Huang, Y.; Wong, B. H. L.; Poon, R. W. S.; Cai, J. J.; Luk, W.-k.; Poon, L. L. M.; Wong, S. S. Y.; Guan, Y.; Peiris, J. S. M.; Yuen, K.-y. (2004). "Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia". *Journal of Virology*. 79 (2): 884–95. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005. PMC 538593. PMID 15613317.

Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci* 2020; 16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472. <https://www.ijbs.com/v16p1686.htm>

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Eng J Med*. 2012;367:1814–1820.